

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



TESIS DOCTORAL

**Nuevas señales y mecanismos implicados en la regulación de
las células hepáticas y su relevancia en hepatocarcinogénesis:**

papel de BMP9 y TGF-beta

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María García Álvaro

Directoras

Aránzazu Sánchez Muñoz
Blanca María Herrera González

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR II

**NUEVAS SEÑALES Y MECANISMOS IMPLICADOS
EN LA REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS HEPÁTICAS
Y SU RELEVANCIA EN HEPATOCARCINOGENÉISIS.
PAPEL DE BMP9 Y TGF-BETA.**

TESIS DOCTORAL

María García Álvaro

MADRID 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR II

TESIS DOCTORAL

**Nuevas señales y mecanismos implicados en la
regulación de las células hepáticas y su
relevancia en hepatocarcinogénesis.
Papel de BMP9 y TGF-beta.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María García Álvaro

Directoras

Aránzazu Sánchez Muñoz
Blanca M^a Herrera González

Madrid 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de la Dra. Aránzazu Sánchez Muñoz y la Dra. Blanca M^a Herrera González.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación a través de proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-12477), del fondo de investigación sanitarias (FIS) Instituto Carlos III (PI10/00274), las ayudas del Programa de Financiación de Grupos de Investigación UCM (Ref.920359) y la Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2402). La autora ha disfrutado de un contrato de personal de apoyo a la investigación asociado a este último proyecto.

OPTA AL GRADO DE DOCTOR

María García Álvaro

MADRID 2015

A mis padres, a mi hermano
A Natxo

***“Hay una fuerza motriz
más poderosa que el
vapor, la electricidad
y la energía atómica:
la voluntad”***

Albert Einstein

ABREVIATURAS

ActR	Activin Receptor
AFP	Alpha-fetoprotein
Akt	AK strain Transforming;v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALB	Albumin
ALK	Activin Like Kinase
AMH	Anti-Müllerian Hormone
ATCC	American Tissue Cell Culture
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
Bim	Bcl-2-like-11
Bmf	Bcl-2 Modifying Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	BMP Receptor
BrdU	Bromodeouridina
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CDE	Cholin-Deficient, Ethionine-Supplemented
Cdk	Cyclin dependent kinase
cDNA	Complementary DNA
CK	Cytokeratin
CMV	Citomegalovirus
Co-Smad	Common mediator Smad
cpm	Cuentas por minuto
Ct	Cycle threshold
CSCs	Cancer Stem Cells
DCFH-DA	Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate
DDC	3,5 dietoxycarbonil-1.4 dihidro-colina
Dllk	Delta-like protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates
DTT	Dithiothreitol
ECAR	Extracellular Acidification Rate
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethilendiaminotetraacetic

EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GDF	Growth/Differentiation Factor
γ-GCS	Gamma Glutamylcysteine Synthetase
Gusb	Beta-glucuronidase
HCC	Hepatocellular Carcinoma
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGF	Hepatocyte Growth Factor
I Smad	Inhibitory Smad
Id	Inhibitor of differentiation/DNA binding
IFN-γ	Interferon gamma
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IP	Yoduro de propidio
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
LDH	Lactate dehydrogenase
Ltβ	Lymphotoxin beta
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MEFs	Mouse embryonic fibroblasts
MEM	Minimum Essential Medium
MET	Mesenchymal to Epithelial Transition
MIS	Müllerian Inhibiting Substance
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NFκB	Nuclear factor- κ B
NOX	NADPH oxidase
OCR	Oxygen Consumption Rate
p/v	peso/volumen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Proteína quinasa C
PLCγ	Phospholipase C-gamma
PUMA	p53-Upregulated Modulator of Apoptosis

PVDF	Polyvinylidene difluoride
q-RTPCR	Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
Ras	Rat Sarcoma
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	revoluciones por minuto
R-Smad	Receptor activated Smad
S.E.M.	Error estándar de la media
Sca-1	Stem cell antigen 1
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SF	Scatter factor
siRNA	Short interfering Ribonucleic Acid
SOD	Superoxide Dismutase
STAT-3	Signal transducer an activator of transcription
TAE	Tris Acetate EDTA
TCA	Trichloroacetic acid
TGFR	TGF- β Receptor
TGF-α	Transforming Growth Factor-alpha
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
Thy-1	Thymocyte differentiation antigen
TIC	Tumor Initiating Cell
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
Tm	Melting Temperature
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TTBS	Tween-Tris buffered saline

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1. Hígado y regeneración hepática.....	3
1.1. Regeneración hepática	3
1.1.1. Papel de las células progenitoras en la regeneración hepática	5
1.2. Relevancia del estudio de las células ovas.....	8
2. CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC)	9
2.1. Origen celular del HCC	10
2.2. Mecanismos moleculares del HCC.....	11
3. Superfamilia de TGF-β. Relevancia en el contexto hepático	12
3.1. TGF- β	14
3.1.1. Señalización medida por TGF- β	14
3.1.2. Actividades biológicas del TGF- β Relevancia en hígado.....	15
A) TGF- β en inhibición del crecimiento y apoptosis	15
B) TGF- β en EMT	17
3.1.3. Papel del estrés oxidativo en las actividades biológicas inducidas por TGF- β en el hígado.....	20
3.1.4. TGF- β como diana terapéutica	23
3.2. BMP9.....	24
3.2.1. Señalización mediada por BMP9	24
3.2.2. Actividades biológicas de BMP9	25
3.2.3. Relevancia de BMP9 en hígado	25
3.2.4. BMPs como diana terapéutica	26
4. Vía de HGF/c-Met. Relevancia en el contexto hepático.....	27
4.1. Señalización mediada por HGF/c-Met	27
4.2. Actividades biológicas de HGF/c-Met.....	28
4.3. Relevancia de la vía HGF/c-Met en hígado	29
4.4. HGF/c-Met como diana terapéutica	31

2. ANTECEDENTES33

- 1. Resultados anteriores del grupo en relación a BMP9 y su implicación en la regulación de las células hepáticas y relevancia en hepatocarcinogénesis..... 35**
- 2. Resultados anteriores del grupo en relación al TGF- β y su implicación en la regulación de las células hepáticas y relevancia en hepatocarcinogénesis y regeneración..... 35**

3. OBJETIVOS41

4. MATERIALES Y MÉTODOS45

- 1. Modelos celulares..... 47**
 - 1.1. Líneas celulares47
 - 1.1.1. Células progenitoras hepáticas o células ovas.....47
 - 1.1.2. Hepatocitos neonatales y adultos47
 - 1.1.3. Líneas celulares de tumor hepático48
 - 1.2. Condiciones de cultivo celular.....48
- 2. Factores de crecimiento e inhibidores utilizados 50**
- 3. Aislamiento del DNA genómico 51**
- 4. Análisis de la expresión génica mediante PCR 52**
 - 4.1. Aislamiento de RNA.....52
 - 4.2. Síntesis de cDNA.....52
 - 4.3. RT-PCR semicuantitativa52
 - 4.4. RT-PCR cuantitativa53
- 5. Silenciamiento génico mediante siRNA 55**
- 6. Ensayos de actividad transcripcional..... 55**
- 7. Análisis de la expresión de proteínas mediante Western blot 55**
 - 7.1. Obtención de extractos proteicos55
 - 7.2. Cuantificación de proteínas56
 - 7.3. Electroforesis de proteínas56
 - 7.4. Transferencia de proteínas57

7.5. Inmunodetección de proteínas.....	57
8. Análisis de la viabilidad y la proliferación celular.....	59
8.1. Contaje de células.....	59
8.2. Cristal violeta	59
8.3. Incorporación de BrdU.....	59
8.4. Incorporación de timidina tritiada.....	60
8.5. Tinción nuclear con yoduro de propidio: núcleos mitóticos	60
8.6. Análisis del contenido intracelular de DNA por citometría de flujo	60
9. Crecimiento independiente de anclaje: Formación de focos en agar	61
10. Tinción de β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal)	61
11. Análisis de la muerte celular por apoptosis	62
11.1. Tinción nuclear con yoduro de propidio: núcleos apoptóticos	62
11.2. Análisis del contenido intracelular de DNA por citometría de flujo	62
11.3. Tinción con anexina V/IP y análisis mediante citometría de flujo	62
12. Cuantificación de la producción de radicales libres de oxígeno (ROS)	63
13. Cuantificación de proteínas carboniladas	63
14. Determinación del consumo de oxígeno	64
15. Medida de la producción de lactato.....	66
16. Cuantificación del número de mitocondrias	66
17. Ensayos de invasión	67
18. Estudio estadístico	67

5. RESULTADOS 69

1. Papel de BMP9 en la proliferación y supervivencia de células tumorales hepáticas y en células hepáticas en distintos estadios de desarrollo	71
1.1. BMP9 promueve crecimiento celular en células tumorales hepáticas pero no hepatocitos no transformados	71
1.2. La producción autocrina de BMP9 mantiene el crecimiento dependiente e independiente de anclaje en células HepG2	77
1.3. BMP9 aumenta la proliferación e impide la apoptosis mediada por ausencia de suero en células HepG2	81

2. Vías de señalización implicadas en el efecto inducido por BMP9 en células HepG2.....	85
2.1. BMP9 activa vías canónicas y no canónicas en células HepG2	85
2.2. La vía de PI3K/Akt no está implicada en el crecimiento celular mediado por BMP9 en células HepG2	88
2.3. La vía de p38MAPK está implicada en el efecto de supervivencia inducido por BMP9 en células HepG2.....	89
3. Establecimiento y caracterización de una línea estable de células ovals que ha sufrido un proceso de EMT	93
3.1. Inducción de EMT crónica en células ovals por tratamiento con TGF- β	93
3.2. La ausencia de c-Met impide la expansión de las células ovals que han sufrido EMT	95
4. Caracterización fenotípica y funcional de las células ovals que han sufrido EMT	97
4.1. Las células ovals sufren importantes cambios en su fenotipo, su capacidad proliferativa e invasiva y supervivencia tras una EMT crónica	97
4.2. Cambios inducidos en la función mitocondrial y el metabolismo oxidativo tras la EMT crónica en células ovals.....	102

6. DISCUSIÓN 111

1. BMP9 ejerce un papel protumorigénico en células tumorales promoviendo supervivencia a través de la vía de p38MAPK	113
2. TGF- β promueve en células ovals un proceso de EMT asociado a importantes cambios fenotípicos y funcionales. La vía HGF/c-Met es imprescindible para la expansión celular post-EMT	120
3. Discusión general.....	128

7. CONCLUSIONES 131

8. BIBLIOGRAFÍA 135

9. ABSTRACT 155

1. INTRODUCCIÓN

1. HÍGADO Y REGENERACIÓN HEPÁTICA

El hígado es un órgano central en la fisiología debido a las numerosas funciones que lleva a cabo (Desmet, 2001) (**Figura 1**). Entre éstas se incluyen el metabolismo de carbohidratos, de compuestos nitrogenados y de lípidos; el almacenamiento de glucógeno, de vitaminas (A, B12) y de minerales (hierro y cobre); la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos y urea; el mantenimiento de los niveles de colesterol y la secreción de bilis; así como la detoxificación de drogas y la producción de proteínas plasmáticas y hormonas. Además, durante el desarrollo fetal el hígado asume una función hematopoyética, debido a que las células madre sanguíneas migran del saco vitelino al hígado en desarrollo donde desempeñan su función.

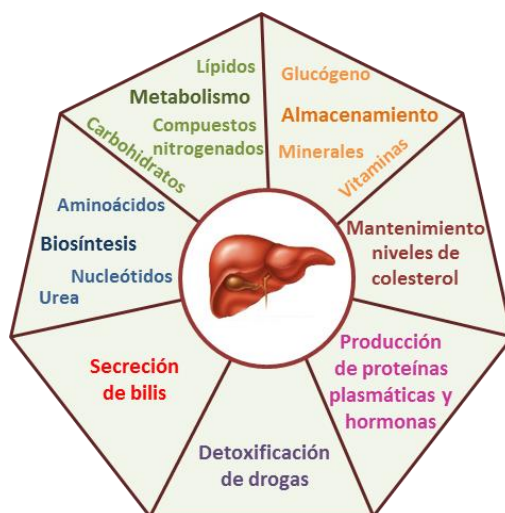


Figura 1. Principales funciones del hígado.

En el hígado cohabitan diferentes poblaciones celulares (Grisham, 1983). Los hepatocitos constituyen la fracción mayoritaria, en torno a un 60% de la masa celular hepática y un 80% del volumen del órgano. Los hepatocitos, junto con los colangiocitos (o células que forman el conducto biliar), constituyen los tipos celulares de naturaleza epitelial responsables de llevar a cabo la casi totalidad de las funciones hepáticas (Spear *et al.*, 2006). Además, hay otras poblaciones celulares residentes en el hígado como las células de Kupffer, las células estrelladas o células de Ito, las células endoteliales sinusoidales y los fibroblastos (Malarkey *et al.*, 2005).

1.1. Regeneración hepática

En condiciones fisiológicas, el hígado mantiene un equilibrio entre la pérdida y la ganancia del número de células que es llevado a cabo por la división de las propias células parenquimáticas maduras, esto es, los hepatocitos y las células del ducto biliar (Grompe, 2005; Knight *et al.*, 2005). Los hepatocitos poseen una vida media larga, de aproximadamente un año, lo que da lugar a una renovación lenta de

la población hepática, en contraste con la rápida renovación de otros tejidos como la piel o el epitelio del tracto intestinal que se produce en menos de dos semanas.

Debido a su localización anatómica y su función fisiológica de detoxificación, las células hepáticas están expuestas constantemente a toxinas; así el hígado sufre daños de diferente etiología, como infecciones por virus hepatotropos (como virus de la hepatitis B o C), enfermedades (metabólicas, genéticas o inmunes) y daños causados por agentes xenobióticos como drogas o alcohol, pudiendo conducir a cuadros clínicos crónicos como esteatosis, fibrosis, hepatitis o cirrosis, que en último término pueden desencadenar el desarrollo de distintas formas de cáncer hepático. En cualquier caso, el daño hepático crónico compromete la integridad funcional del hígado, lo que conduce con frecuencia a la muerte debido a que la función fisiológica del hígado es esencial para la supervivencia.

El hígado posee una alta capacidad regenerativa, hecho que es característico de este órgano y que es conocido desde la antigüedad. La regeneración hepática consiste en una proliferación e hipertrofia celular compensatoria, encaminada a restaurar la masa hepática inicial, con el fin de satisfacer las necesidades funcionales. Sin embargo, este proceso no va acompañado de la reconstitución de las estructuras anatómicas originales (Mao *et al.*, 2014). En condiciones normales la regeneración es llevada a cabo por las propias células maduras del hígado, a la cabeza de ellas, los hepatocitos. El modelo más utilizado para estudiar este proceso es la hepatectomía parcial o resección quirúrgica de dos terceras partes del hígado (Michalopoulos, 2010; Michalopoulos, 2013). En respuesta a este daño agudo, los hepatocitos que se encuentran quiescentes en fase G0 abandonan esta fase y entran de nuevo en ciclo bajo la influencia de distintos factores de crecimiento (Stocker and Heine, 1971). Este proceso se ha estudiado en profundidad en roedores, donde al reseccionar el 70% del hígado el remanente hepático es capaz de alcanzar de nuevo la masa original en aproximadamente 10 días (Higgins and Anderson, 1931). Este proceso también tiene lugar en humanos: tras el trasplante del lóbulo derecho, tanto el hígado del receptor como el del donante alcanzan su masa original a los 60 días de la intervención (Marcos *et al.*, 2000).

A pesar de la alta capacidad regenerativa del hígado, pueden darse situaciones en las que el daño existente impida la proliferación de los hepatocitos o que ésta sea insuficiente, como puede ocurrir en condiciones de enfermedad hepática crónica o por senescencia replicativa de la mayoría de los hepatocitos. En estas situaciones se activa una vía alternativa en la que los actores principales son las células progenitoras hepáticas (Alison *et al.*, 2009; Duncan *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2011).

1.1.1. Papel de las células progenitoras en la regeneración hepática

Las células progenitoras son células inmaduras de pequeño tamaño (10 μm), basófilas, con un citoplasma muy escaso y un gran núcleo ovalado que constituye la mayor parte de la célula, por el cual reciben el nombre de células ovales. Su origen es aun motivo de controversia, pero se piensa que procederían de las células madre que se localizan en las ramas más pequeñas del árbol biliar intrahepático. Son células capaces de diferenciarse tanto a hepatocitos como a células del epitelio biliar, aunque también se ha descrito su capacidad de formar linajes celulares no hepáticos como epitelio intestinal y células pancreáticas (Zheng and Taniguchi, 2003; Knight *et al.*, 2005).

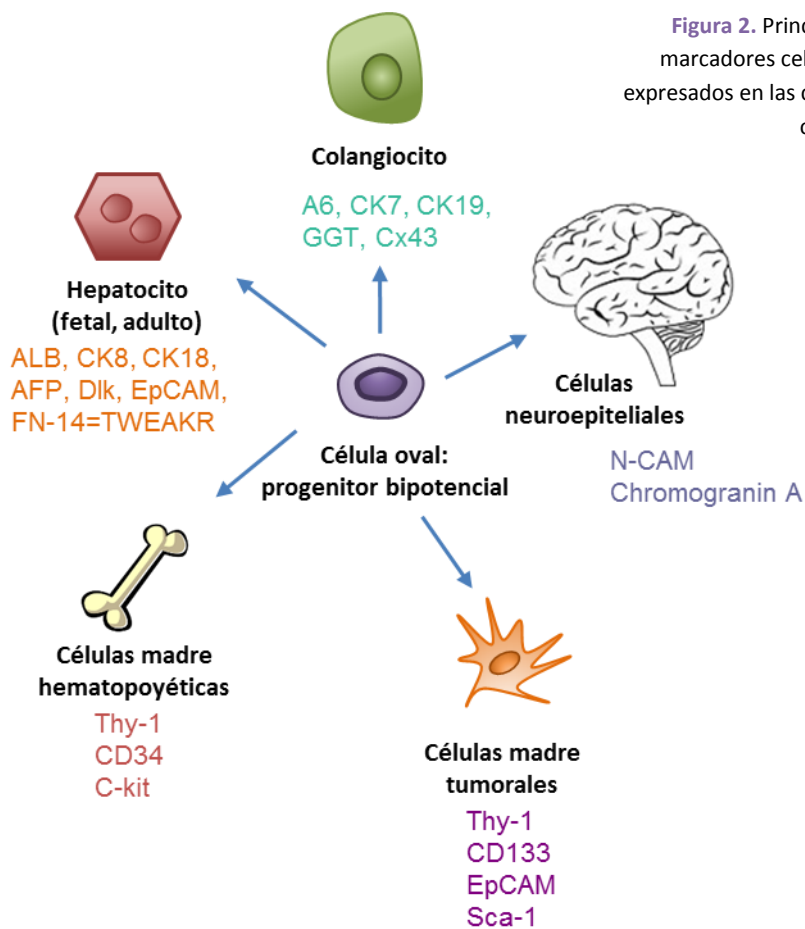


Figura 2. Principales marcadores celulares expresados en las células ovales.

En consonancia con su naturaleza progenitora bipotencial (**Figura 2**), poseen un fenotipo singular ya que expresan marcadores de hepatocitos, tanto inmaduros, como Dlk (*Delta-like protein*) y AFP (*alpha-fetoprotein*), como maduros, incluyendo CK 8 y 18 (citoqueratina 8 y 18), ALB (albúmina) y c-Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos o HGF). Además, muestran otros marcadores típicos de linaje biliar, como CK19, A6 y OV6 (Tanimizu *et al.*, 2004) y marcadores de células madre/progenitoras como Thy-1 (*Thymocyte differentiation antigen*=CD90), Sca-1 (*Stem cell antigen 1*), CD34 (*Cluster of Differentiation 34*) c-kit y nestina (Santoni-Rugiu *et al.*, 2005); así como marcadores de distintos linajes como N-CAM y cromogranina, de célula neuroepitelial (Knittel *et al.*, 1996; Dezso *et al.*, 2007; Dudas *et al.*, 2007; Dudas *et al.*, 2009; Van Hul *et al.*, 2009).

La activación y expansión de células progenitoras adultas hepáticas en modelos animales generalmente se induce mediante la exposición a una variedad de agentes químicos y carcinogénicos, aplicados tanto de forma individual como combinados con tratamiento quirúrgico como la hepatectomía parcial. Los modelos más utilizados en ratones son el daño hepático producido por una dieta deficiente en colina y suplementada con etionina (dieta CDE) o una dieta suplementada con 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidro-colina (dieta DDC) (Akhurst *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003). Estas toxinas bloquean la mitosis de los hepatocitos o provocan daño hepático con la consiguiente muerte de los hepatocitos. Esto produce estrés oxidativo crónico y/o inflamación que activa una potente respuesta regenerativa en el hígado para reparar el parénquima hepático dañado. Tras su activación, las células sufren una intensa proliferación y a continuación son capaces de migrar por el parénquima hepático donde posteriormente son capaces de diferenciarse hacia hepatocitos (Alison *et al.*, 2009). A todo este proceso se le conoce como “reacción de la célula oval” o “respuesta de la célula oval” (**Figura 3**). Las distintas fases de la respuesta regenerativa (activación, proliferación, migración y diferenciación) de las células ovales están controlados por un gran número de factores de crecimiento y citoquinas que se expresan en el lugar del daño o que llegan al hígado por el sistema circulatorio. Sólo algunos de estos factores han sido caracterizados, ya que la redundancia funcional y/o los mecanismos de compensación que existen enmascaran las funciones de muchos de ellos (Mao *et al.*, 2014). En este sentido, uno de los campos de investigación en desarrollo en los últimos años ha sido dilucidar los factores que determinan la activación diferencial de las dos respuestas regenerativas, la clásica y primaria, mediada por los hepatocitos; y la secundaria, mediada por las células ovales. Las evidencias podrían apuntar a una activación diferencial en los programas celulares en respuesta a los mismos factores, dando

lugar a diferentes respuestas celulares (Knight *et al.*, 2005; Santoni-Rugiu *et al.*, 2005; Viebahn and Yeoh, 2008). Así, ante un daño crónico son las citoquinas las señales que se encargan de la activación de la respuesta de la célula oval. Se ha descrito la implicación del TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*), Lt β (*lymphotoxin beta*), IFN- γ (interferon gamma) y la IL-6 (*interleukin 6*) en la modulación de dicha respuesta (Erker and Grompe, 2007). Estas señales podrían proceder de células mesenquimales como las células estrelladas, que están en contacto con las células ovals (Paku *et al.*, 2001). Otras señales reguladoras son la quimioquina SDF-1 (*Stromal cell-derived factor 1*); factores de crecimiento como el HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), el TGF- α (*Transforming Growth Factor-alpha*), el EGF (*Epidermal Growth Factor*) y el TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*), este último actuando como factor inhibidor capaz de contrarrestar la respuesta regenerativa; y la vía canónica Wnt/ β -catenina (Hu *et al.*, 2007; Apte *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2009).

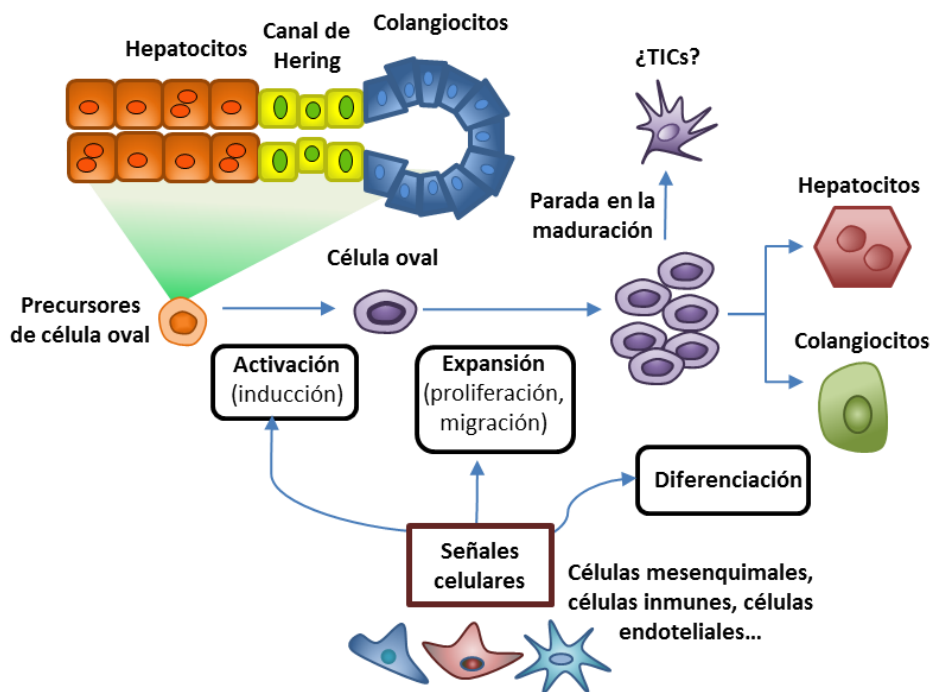


Figura 3. Fases de activación de las células ovals y posible transformación. Adaptada de Tanaka *et al.*, 2011.

Con posterioridad a estos estudios realizados en roedores, se ha descrito una respuesta análoga a la respuesta de la célula oval en humanos, concretamente en situaciones patológicas que cursan con fibrosis e inflamación, como hepatitis viral

crónica, cirrosis, colestasis, hígado graso y diferentes tipos de cáncer hepático (Libbrecht and Roskams, 2002; Roskams, 2003; Roskams, 2006). La intensidad de la respuesta, aquí denominada “reacción ductular”, al igual que ocurre en roedores, es mayor cuanto mayor es el daño hepático y más severa es la fibrosis y la inflamación hepática (Lowes *et al.*, 1999; Libbrecht *et al.*, 2000; Roskams, 2003). Dado que la identidad precisa de las células que participan en dicha respuesta se desconoce, a las células progenitoras de origen humano se les ha dado el nombre de “célula intermedia hepatobiliar”. Otros términos usados son células progenitoras ductulares, células ductulares atípicas y células progenitoras hepáticas periductulares.

1.2. Relevancia del estudio de las células ovals

Las enfermedades hepáticas crónicas tienen una alta incidencia en la población. Además, llevan asociadas graves consecuencias clínicas debido a la pérdida masiva de hepatocitos funcionales y al proceso de fibrosis concomitante. En la actualidad, el tratamiento estándar frente al fallo hepático es el trasplante de órgano, pero debido a las numerosas limitaciones y dificultades que presenta aplicar este procedimiento existe un gran interés en desarrollar otros abordajes terapéuticos. El trasplante de hepatocitos aislados se presenta como una posible opción terapéutica para el tratamiento de enfermedades metabólicas congénitas hepáticas. Este procedimiento es utilizado en algunos casos para el mantenimiento estable de los pacientes hasta la recepción del órgano o hasta la recuperación de fallo hepático fulminante (Sokal *et al.*, 2003). Sin embargo, esta alternativa también plantea importantes inconvenientes como la baja tasa de integración y supervivencia de los hepatocitos trasplantados y la dificultad de manipulación y cultivo *in vitro* (Hughes *et al.*, 2012).

Por todo esto, las células ovals/progenitoras hepáticas se presentan como una posible alternativa terapéutica. Experimentos realizados en ratones con fallo hepático han puesto de manifiesto la capacidad de las células ovals para integrarse en el parénquima hepático, diferenciarse a hepatocito y repoblar el hígado, aunque la eficiencia de repoblación varía mucho en función del modelo utilizado (Oertel and Shafritz, 2008). El trasplante de estas células podría constituir una prometedora herramienta terapéutica para numerosas enfermedades hepáticas (Sandhu *et al.*, 2001) ya que presenta ventajas como la elevada tasa de proliferación y la fácil manipulación *in vitro* de las células, un menor tamaño que aumentaría la eficiencia de integración y, además, una mayor accesibilidad habiéndose obtenido de hígado de individuos adultos. Además, pueden obtenerse de otros tejidos como médula ósea, cordón umbilical, piel y tejido adiposo células madre/progenitoras que

pueden ser dirigidas hacia el linaje hepático (Cantz *et al.*, 2008). Esta última opción es quizás la ventaja más atractiva de cara a evitar las terapias de inmunosupresión y, además, eliminar la posibilidad de rechazo.

Por otra parte, el conocimiento de las señales que regulan la regeneración vía células progenitoras resulta especialmente interesante como estrategia para potenciar o estimular la capacidad regenerativa de las células endógenas y aumentar así la eficacia del proceso, en lugar de realizar un trasplante. Esto es de especial relevancia si se tiene en cuenta que estas células recorren un largo camino desde su trasplante hasta su diferenciación a hepatocitos funcionales, y que el entorno de un hígado dañado puede causar alteraciones en el destino final de estas células y por consiguiente en el desenlace del proceso regenerativo. De hecho, una de las principales incertidumbres sobre la posible aplicación de las células progenitoras en terapia es la asociación que se ha establecido recientemente por algunos autores entre la expansión prolongada de estas células y el agravamiento del proceso fibrótico (Kuramitsu *et al.*, 2013). Además, las células progenitoras hepáticas son susceptibles de sufrir transformación maligna en un ambiente hepático tóxico (Steinberg *et al.*, 1994). Todo esto hace patente la necesidad de conocer los mecanismos de señalización que regulan el comportamiento de las células progenitoras, así como el mecanismo por el cual una célula progenitora puede sufrir un proceso de transformación, lo que es crítico para poder diseñar terapias seguras y efectivas.

2. CARCINOMA HEPATOCELULAR (HCC)

El HCC (*Hepatocellular carcinoma*) o carcinoma hepatocelular es el tipo de tumor hepático más común, el quinto tipo de cáncer más frecuente en el mundo y el segundo por causa de muerte con una media de supervivencia de 6 a 16 meses en casos sin tratar. Los factores responsables del mal pronóstico del HCC son el diagnóstico tardío, la cirrosis subyacente y la resistencia a la quimioterapia (McGlynn *et al.*, 2015). De hecho, el proceso de cirrosis asociado a regeneración hepática es uno de los mecanismos patogénicos más

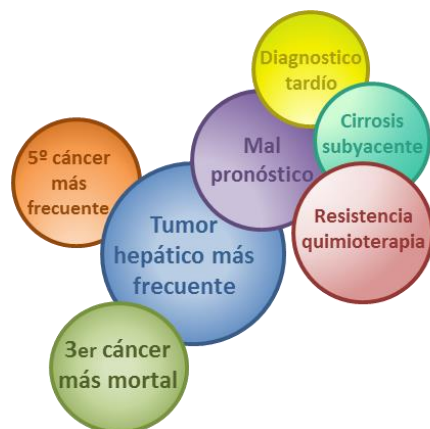


Figura 4. Características del HCC.

importantes en el origen del HCC (Ramakrishna *et al.*, 2013) (Figura 4).

La alta morbilidad y mortalidad asociadas a este tipo de cáncer hacen necesaria la identificación de los mecanismos implicados en el inicio y desarrollo de este proceso para ser utilizados como marcadores de diagnóstico y pronóstico, así como diseñar estrategias terapéuticas más efectivas y seguras.

2.1. Origen celular del HCC

El 40% de los HCC son de origen clonal, y existen dos hipótesis sobre su origen: o bien proceden de células madre que no entran en diferenciación o de células maduras capaces de desdiferenciarse (Sell, 2001). Quizá, la hipótesis más aceptada sería la primera, según la cual, a través de mutaciones oncogénicas y/o aberraciones epigenéticas se generan células que no entran en un estado post-mitótico diferenciado, adquieren capacidad de autorrenovación y tienen mayor probabilidad de acumular mutaciones (Pardal *et al.*, 2003); aunque sigue siendo una idea controvertida debido a la heterogeneidad celular de estos tumores. Ciertamente, la relación entre las células progenitoras hepáticas y los procesos tumorales está descrita por numerosos autores (Lee *et al.*, 2006; Roskams, 2006), habiéndose demostrado que células ovaes transfectadas con un oncogén activado o tras el silenciamiento de un gen supresor de tumores dan lugar a HCC (Braun *et al.*, 1987; Becker *et al.*, 1996; Dumble *et al.*, 2002). Su alta capacidad de proliferación en un ambiente rico en mediadores de inflamación, factores de crecimiento y ROS (Reactive Oxygen Species) (Tirnitz-Parker *et al.*, 2012), junto con su presencia tanto dentro como fuera de los nódulos de HCC afianzan la hipótesis de que estas células sean la diana de transformación que dan lugar a procesos de hepatocarcinogénesis (Fang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). Además, el análisis inmunofenotípico del HCC, muestra que el 28-50% de los tumores expresan marcadores de célula progenitora como CK7 y CK19 (Lo and Ng, 2013) y estos carcinomas tienen un peor pronóstico y una mayor tasa de recurrencia tras la resección quirúrgica y el trasplante hepático (Yang *et al.*, 2010).

Todos estos hechos ponen de manifiesto el posible papel de las células progenitoras hepáticas como células iniciadoras de tumores en la carcinogénesis hepática (Alison and Lovell, 2005; Alison *et al.*, 2009; Marquardt and Thorgeirsson, 2010).

2.2. Mecanismos moleculares del HCC

Aunque los principales factores etiológicos del HCC se han identificado (la infección por virus de la hepatitis B y C, el alcohol y las aflatoxinas) los mecanismos moleculares de la patogénesis no se conocen bien (Kirstein and Vogel, 2014) (**Figura 5**). El HCC es un proceso maligno de desarrollo lento, que se cree que surge a partir de lesiones premalignas en un hígado con daño crónico, en el que existe un proceso inflamatorio y una regeneración continuados. Por tanto, es un proceso complejo, con muchas etapas, resultado de la desregulación de numerosas vías de señalización. Entre los mecanismos que dan lugar a estas alteraciones se han descrito modificaciones tanto genéticas como epigenéticas, entre las que se incluyen aberraciones cromosómicas, mutaciones y alteraciones en vías de señalización. La secuencia concreta de procesos que dan lugar a hepatocarcinogénesis, desde el desarrollo de lesiones preneoplásicas y su progresión a HCC está aún sin determinar (Lachenmayer *et al.*, 2010). La cirrosis está presente en el 80% de los casos de HCC y está considerado como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de esta patología. En general, cualquier condición relacionada con la inflamación crónica del hígado es considerado un factor de riesgo ya que es capaz de causar daño genómico y mitocondrial facilitando el desarrollo de neoplasias (Lachenmayer *et al.*, 2010).

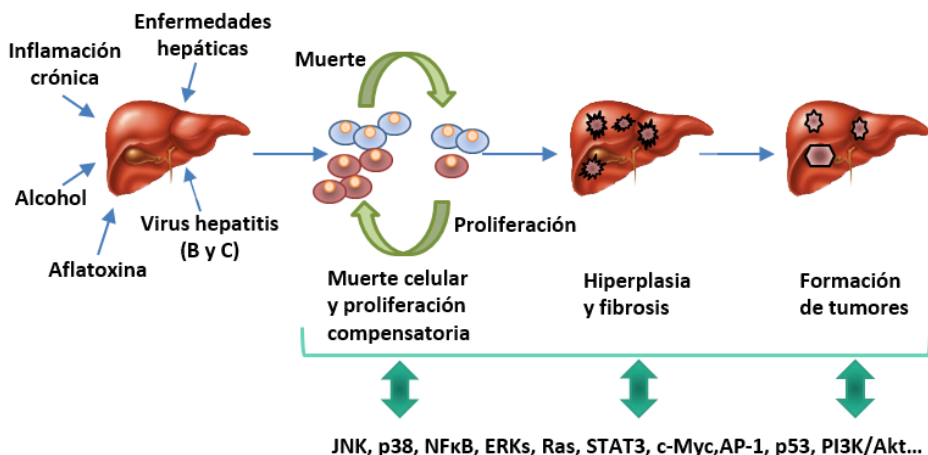


Figura 5. Esquema de la progresión del HCC. Factores de riesgo y mecanismos moleculares implicados. Adaptado de (Min *et al.*, 2011; Bendell *et al.*, 2014).

Entre las señales y rutas para las cuales se ha descrito un papel en el proceso de hepatocarcinogénesis se encuentran Wnt- β -catenina, Hedgehog y Notch, HGF/c-Met, IGF (*Insulin Growth Factor*), PI3K/Akt/mTOR, Ras-MAPKs y TGF- β , entre otras. Todas estas vías se han implicado en procesos de supervivencia y diferenciación,

proliferación y apoptosis celular, así como en migración e invasión favoreciendo la progresión tumoral (Alison *et al.*, 2009; Lachenmayer *et al.*, 2010; Marquardt *et al.*, 2012; Fabregat *et al.*, 2014; Oishi *et al.*, 2014).

3. SUPERFAMILIA DE TGF- β . RELEVANCIA EN EL CONTEXTO HEPÁTICO

La superfamilia de factores de crecimiento TGF- β está formada en humanos por más de 30 miembros, incluyendo isoformas de TGF- β , BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), activinas, inhibinas, MIS/AMH (*Müllerian Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone*), Nodal y GDFs (*Growth/differentiation factors*) (Shi and Massague, 2003).

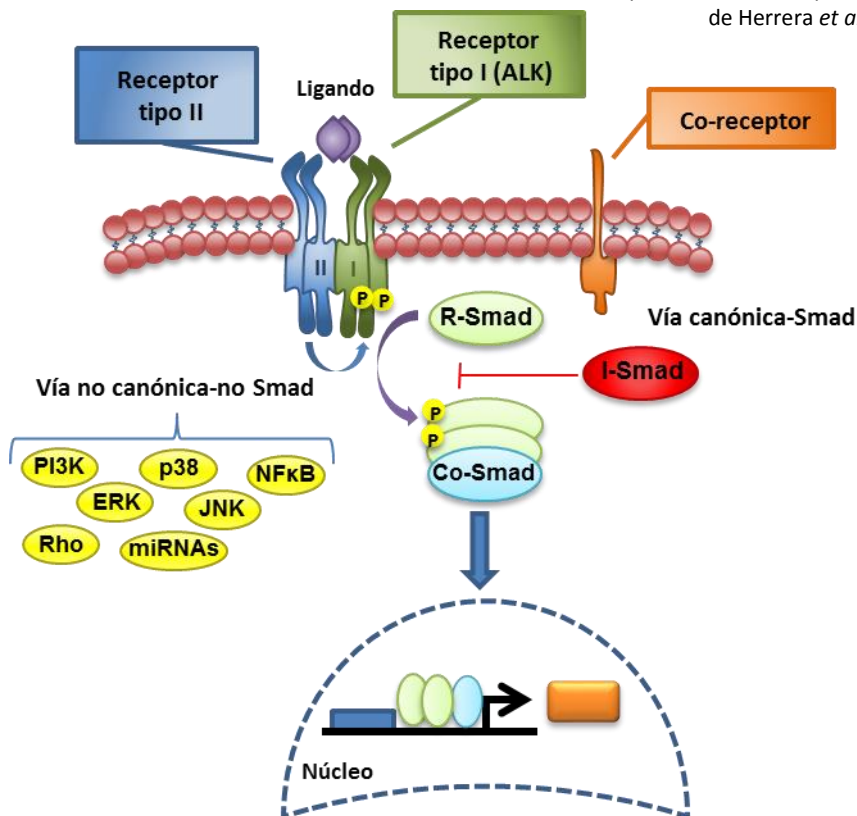
Los miembros de la familia de TGF- β inician su señalización celular (Figura 6) mediante su unión a receptores heterotetraméricos de membrana del tipo serina-treonina quinasa. Están formados por un receptor de tipo I o ALK (*Activin Like Kinase*) de los que se han descrito 7 tipos (ALK1-7) y un receptor de tipo II (T β RIIA y B, AMHRII y BMPRII) (Santibanez *et al.*, 2011; Massague, 2012). Además se han descrito co-receptores (T β RIII, Endoglina, Cripto, RGa, RGMb=DRAGON, Hemojuvelina=RGMc) cuya función principal es regular la unión del ligando al receptor, aunque pueden tener otras funciones adicionales (Bernard *et al.*, 2001; ten Dijke and Arthur, 2007; Gordon and Blobe, 2008).

Una vez que el ligando se ha unido a los receptores, el receptor de tipo II fosforila y activa al receptor de tipo I, el cual recluta y activa a miembros de la familia Smad. Esta familia está formada por 8 miembros divididos en 3 subfamilias: R-Smads o *Receptor activated Smads* (Smad 2, 3, 1, 5, 8), Co-Smad o *Common mediator Smad* (Smad 4) y dos I-Smads o *Inhibitory Smads* (Smad6 y Smad7). Las R-Smads activadas dependen del receptor de tipo I que forma el complejo, de esta manera ALK 1, 2, 3 y 6 fosforilan específicamente Smad 1, 5 y 8, mientras que ALK 4, 5 y 7 fosforilan Smad 2 y 3. Smad4 es un mediador único para todas las R-Smads y es necesario para el ensamblaje de complejos transcripcionales activos y para la mayoría de los efectos de las R-Smads. Las I-Smads son inducidas por la señalización de Smad y actúan como reguladores negativos de la señalización (Shi and Massague, 2003; ten Dijke, 2006; Itoh and ten Dijke, 2007). Una vez que las R-Smad han sido activadas por el receptor, se unen a la Co-Smad formando un complejo que se transloca al núcleo donde en colaboración con otros factores de transcripción, activadores o represores, regula la expresión de genes específicos (Shi and Massague, 2003; Schmierer and Hill, 2007). Además, en muchos casos, miembros de

la superfamilia del TGF- β activan vías independientes de Smads, conocidas como vías no canónicas, que incluyen las MAP quinasas (p38, ERKs y JNK), NF κ B, PI3K/Akt o GTPasas pequeñas tipo Rho, entre otras (Moustakas and Heldin, 2005; Zhang, 2009; Horbelt *et al.*, 2012).

La superfamilia del TGF- β tiene un importante papel en el desarrollo embrionario, así como en el organismo adulto controlando numerosos procesos celulares tales como la proliferación, diferenciación, motilidad y muerte celular (Gordon and Blobel, 2008). Por tanto, alteraciones en esta vía, tanto a nivel de receptores, ligandos o a otros niveles en la vía de señalización, se han relacionado con numerosas patologías de diversa índole, incluyendo alteraciones en el desarrollo y procesos tumorales (Massague, 2008; Padua and Massague, 2009; Santibanez *et al.*, 2011; Weiss and Attisano, 2013).

Figura 6. Principales componentes de la señalización mediada por la superfamilia del TGF- β . Adaptado de Herrera *et al.*, 2012.



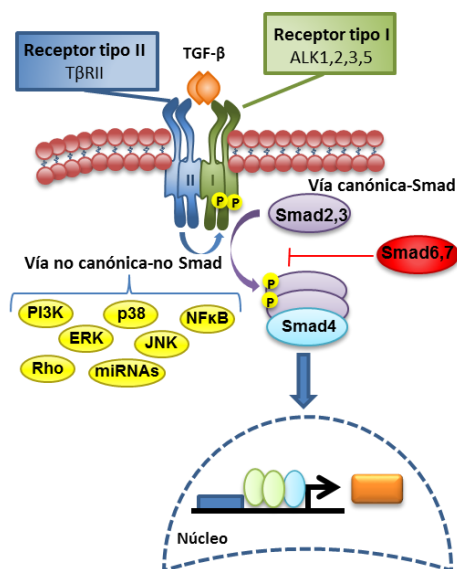
3.1. TGF- β

El TGF- β es una citoquina con 3 isoformas en mamíferos (β 1, β 2, β 3) que ejerce su acción a múltiples niveles, interviniendo en aspectos esenciales de la fisiología y homeostasis tisular, actuando en todo tipo de células siendo su papel crítico tanto en el desarrollo como en el organismo adulto. Así, regula la proliferación, diferenciación, adhesión, migración, muerte y supervivencia celular (Heldin *et al.*, 2009). Dada su implicación en procesos esenciales, la desregulación de esta vía de señalización está descrita en varias patologías como enfermedades autoinmunes, fibrosis y cáncer (Massague, 2008).

3.1.1. Señalización mediada por TGF- β

Todas las células normales y gran parte de las células neoplásicas tienen receptores para el TGF- β en su superficie (Zi *et al.*, 2012) existiendo una gran variedad de respuestas dependiendo del tipo celular y las condiciones ambientales. Las isoformas del TGF- β se unen a un único receptor tipo II (T β RII) y, posteriormente, se une el receptor de tipo I al complejo. El TGF- β se une de forma

casi exclusiva a ALK5, aunque también se ha descrito la unión a otros receptores de tipo I como ALK1 en células endoteliales (Goumans *et al.*, 2003; Lebrin *et al.*, 2005) y ALK2 y ALK3 en algunas células epiteliales (Daly *et al.*, 2008) (Figura 7).



Además de la señalización canónica mediada por Smad2 y 3, TGF- β es capaz de señalizar a través de otras vías no canónicas, entre las que se incluyen las MAPKs (ERKs, p38, JNK), NF κ B, PI3K/Akt y GTPasas pequeñas tipo Rho (Moustakas and Heldin, 2005; Zhang, 2009).

Figura 7. Componentes de la vía de señalización de TGF- β . Adaptado de Herrera *et al.*, 2012.

3.1.2. Actividades biológicas del TGF- β . Relevancia en hígado

A) TGF- β en inhibición del crecimiento y apoptosis

El papel de TGF- β en la inhibición del crecimiento está descrito en diferentes tipos celulares. Concretamente, se ha demostrado que el TGF- β inhibe las actividades de los complejos ciclinaD-Cdk4/6 y ciclina E/Cdk2 (reguladores del ciclo celular), lo que conduce a la hipofosforilación de retinoblastoma y a una disminución de la actividad transcripcional de E2Fs. Dicha respuesta está mediada, principalmente, a través de la inducción de la expresión de inhibidores del ciclo celular, como p15^{INK4b}, p21^{Cip1} y p57^{Kip2}, y la inhibición de la expresión de factores de transcripción como c-Myc y miembros de la familia Id (*Inhibitors of differentiation/DNA binding*) (Heldin *et al.*, 2009).

La apoptosis es un proceso con un importante papel en el desarrollo y la homeostasis de los tejidos. Permite la eliminación de células que han sufrido daños irreparables y que son potencialmente peligrosas, por ello una disminución en la tasa de apoptosis puede provocar enfermedades autoinmunes o procesos tumorales. Por el contrario, un exceso de muerte celular puede llevar a enfermedades degenerativas (Strasser *et al.*, 2011). A nivel celular la apoptosis implica cambios morfológicos y bioquímicos muy característicos, destacando la contracción celular y formación de protuberancias en la membrana que conducen a la formación de cuerpos apoptóticos rodeados de membrana que contienen parte de la célula. Además, la cromatina se condensa y se produce la fragmentación internucleosomal del DNA (Pop and Salvesen, 2009). La inducción de la apoptosis se puede realizar mediante distintas vías, la vía extrínseca mediada por los receptores de muerte, la vía intrínseca o vía mitocondrial y la vía del retículo endoplásmico. En muchos casos estas vías convergen en la mitocondria (Galluzzi *et al.*, 2011).

Existen múltiples estímulos capaces de inducir apoptosis, entre ellos el TGF- β (Heldin *et al.*, 2009). De hecho, su efecto apoptótico se ha descrito en numerosos tipos celulares y está asociado a sus efectos como supresor tumoral (Principe *et al.*, 2014). Los mecanismos moleculares que median dicha respuesta pueden variar en función del modelo celular, pero parece depender de la activación de Smads. Entre los mecanismos descritos, se encuentran la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de las rutas de c-Jun-N-terminal quinasa (JNK), así como la interferencia con algunas rutas de supervivencia (como la fosfatidilinositol-3-quinasa, PI3-K), activando finalmente la ruta mitocondrial de muerte (Sanchez-Capelo, 2005; Heldin *et al.*, 2009).

Nuestro grupo lleva años estudiando la respuesta de las células hepáticas al TGF- β . En el hígado, el proceso de apoptosis desempeña un papel crucial tanto

durante la embriogénesis, eliminando células innecesarias para la estructura o función, como también durante la etapa adulta para mantener la homeostasis y el control de la población celular (Guicciardi and Gores, 2005). Asimismo, es importante en el proceso de regeneración hepática, donde el TGF- β es considerado un regulador negativo clave del proceso, ya que actúa como inhibidor de la proliferación de los hepatocitos e inductor de apoptosis (Fausto et al., 2006). Nuestro grupo ha descrito como a dosis bajas el TGF- β actúa inhibiendo el crecimiento de hepatocitos induciendo parada en G1 (Sanchez et al., 1995). Sin embargo, a dosis más altas, el TGF- β induce apoptosis, mediante un proceso dependiente de estrés oxidativo, que cursa con un aumento de los niveles de ROS, una disminución del potencial de membrana mitocondrial, la liberación del citocromo c y la consiguiente activación de caspasas (Sanchez et al., 1996; Herrera et al., 2001). Las NOXs (NADPH oxidases), enzimas implicadas en la producción de ROS, en particular la Nox4, participan en la apoptosis inducida por el TGF- β (como veremos en el apartado 3.1.3.) (Carmona-Cuenca et al., 2006; Carmona-Cuenca et al., 2008).

Se ha descrito que las células progenitoras hepáticas son resistentes a los efectos anti-proliferativos y apoptóticos del TGF- β (Clark *et al.*, 2005). En esta misma línea, Nguyen y colaboradores (Nguyen *et al.*, 2007) demuestran que las células ovals son menos sensibles a la muerte inducida por TGF- β que los hepatocitos, lo que supondría una ventaja para estas células, y proporcionaría un mecanismo que las permitiría proliferar en un ambiente inhibitorio donde la proliferación de los hepatocitos está impedida. No obstante, nuestros datos indican que las células ovals responden en términos de inhibición de crecimiento y apoptosis al TGF- β (del Castillo *et al.*, 2008b; Martinez-Palacian *et al.*, 2013), lo que estaría en consonancia con datos *in vivo* que indican que la sobreexpresión de TGF- β causa una disminución en la expansión de células ovals en modelos de daño hepático (Preisegger *et al.*, 1999). Según la caracterización de la respuesta apoptótica al TGF- β en células ovals llevada a cabo en nuestro grupo, el TGF- β induce apoptosis por la vía mitocondrial, con alteración del potencial de membrana mitocondrial y aumento de la expresión de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 como Bim (Bcl-2-like-11) y Bmf (Bcl-2 Modifying Factor). Además, al igual que en hepatocitos, este proceso está asociado al estrés oxidativo inducido por TGF- β (Martinez-Palacian *et al.*, 2013).

Aunque en células normales y en los primeros estadios de la progresión tumoral el TGF- β actúa como supresor tumoral inhibiendo el crecimiento de la célula e induciendo apoptosis, sin embargo, en estadios posteriores, muchas células tumorales se vuelven refractarias a los efectos supresores del TGF- β , por una

alteración en la vía de señalización, a distintos niveles, bien directa o indirecta, o por des-regulación de otras vías de señalización (Fabregat *et al.*, 2007; Fabregat, 2009a; Meulmeester and ten Dijke, 2011). En estas condiciones, el TGF- β pasa de actuar como supresor a promotor tumoral, dado que se mantienen otras respuestas, como la capacidad de sufrir una EMT (*Epithelial Mesenchymal Transition*), proceso que se describe en el siguiente apartado. Este cambio de respuesta, de supresor tumoral en etapas tempranas a promotor tumoral en etapas más avanzadas, es conocido como paradoja del TGF- β (Massague, 2008); y ha permitido realizar una clasificación molecular de los tumores y poder discriminar subgrupos de HCC en función de si presentan un patrón de expresión “temprano” o “tardío” de la señalización de TGF- β (Coulouarn *et al.*, 2008).

Estudios *in vitro*, en células de HCC, demuestran que el TGF- β juega un papel dual ejerciendo de supresor y promotor tumoral (Caja *et al.*, 2007). Así, aunque induce señales apoptóticas a través de la mitocondria y la inducción de Nox4, también activa vías de supervivencia como la de Akt a través de la activación del receptor de EGF. Además, se sabe que estas células presentan una sobreactivación de la vía de las ERKs/MAPK que confiere resistencia a los efectos pro-apoptóticos del TGF- β mediante la inhibición de la expresión de Nox4, proteína crítica para la apoptosis (Caja *et al.*, 2009).

B) TGF- β en EMT

La EMT es el mecanismo biológico por el cual una célula de fenotipo epitelial adquiere un fenotipo mesenquimal a través de cambios bioquímicos, genéticos y epigenéticos. La EMT puede revertirse mediante el fenómeno denominado MET (*Mesenchymal Epithelial Transition* o transición mesénquima-epitelio).

Un amplio espectro de factores de transcripción regula el proceso de EMT. Los factores de la familia Snail, SNAI1 (o Snail) y SNAI2 (anteriormente Slug) fueron los primeros factores descritos en la modulación del proceso. Posteriormente se han descrito otros factores capaces de inducir EMT como Twist, Zeb1 y Zeb2 (Vandewalle *et al.*, 2009; Zheng and Kang, 2014). Snail es considerado el regulador central encargado de disparar un complejo programa transcripcional que incluye multitud de genes implicados en el cambio de fenotipo, como se muestra en la [figura 8](#) (Cano *et al.*, 2000).

Tras el proceso de EMT, el fenotipo de las células se caracteriza por la pérdida de la polaridad basolateral-apical debido a la pérdida de proteínas de complejos de polaridad (como Par3 y Par6) y de proteínas de las uniones intercelulares como E-cadherina, ZO-1, ocludina y claudina. Además, las células sufren una remodelación

del citoesqueleto, adquieren capacidad migratoria y capacidad de remodelar la matriz extracelular, lo que a su vez favorece la capacidad invasiva (Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Martínez-Estrada *et al.*, 2006; Hugo *et al.*, 2011; Nieto and Cano, 2012) (Figura 9).

Numerosas señales como factores de crecimiento e hipoxia disparan el proceso de EMT, siendo el TGF- β uno de los inductores más potentes y mejor estudiados, lo que está relacionado con su papel en la regulación de los procesos de cicatrización de heridas, fibrosis y cáncer (Nieto, 2011; O'Connor and Gomez, 2014). El tratamiento con TGF- β , por sí solo, es suficiente para inducir EMT en algunas células epiteliales *in vitro* (Brown *et al.*, 2004). Tanto la vía dependiente de Smad, como las vías no canónicas, se han visto implicadas en la inducción de EMT en distintos tipos celulares, existiendo interacción entre ambas vías (Derynck *et al.*, 2014). De esta forma, vía Smads, el TGF- β es capaz de regular la expresión de factores de transcripción de EMT y cooperar en el control de los genes diana (Moustakas and Heldin, 2005; Lamouille *et al.*, 2014). Por su parte, las vías no canónicas cooperan con las proteínas Smads en la regulación de la expresión génica, modulando su estabilidad y actividad (Derynck *et al.*, 2014), a la vez que ejercen actividades por sí mismas implicadas en remodelación del citoesqueleto y cambios en las uniones célula-célula.

La EMT está implicada en el desarrollo embrionario y además participa en la cicatrización y remodelación tisular tras daño y en la metástasis tumoral (Zeisberg and Neilson, 2009). Un proceso de EMT no resuelto puede conducir a procesos fibróticos como se ha descrito en distintos órganos, incluido el hígado (Zeisberg *et al.*, 2007). Además, la EMT juega un papel principal en la diseminación de células transformadas durante el desarrollo tumoral, siendo clave por tanto para el proceso de metástasis en diferentes tipos de cáncer, como el HCC (van Zijl *et al.*, 2009).

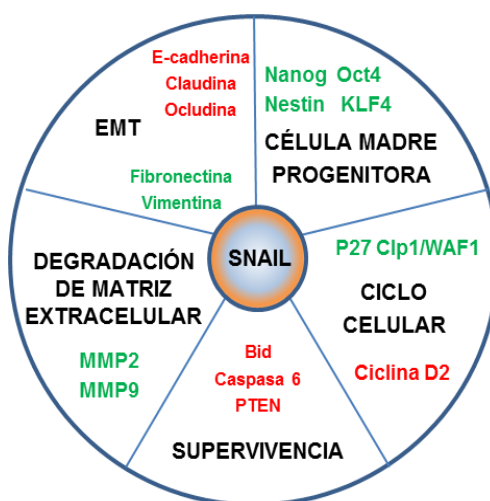


Figura 8. Control transcripcional de Snail y regulación de múltiples funciones biológicas. Aumento o inducción (verde) y disminución o represión (rojo) de determinados genes.

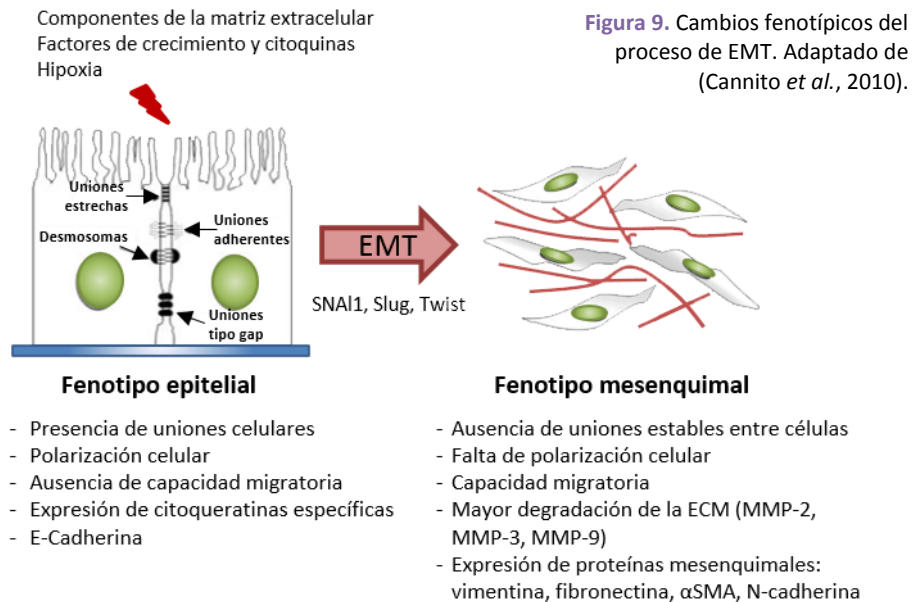


Figura 9. Cambios fenotípicos del proceso de EMT. Adaptado de (Cannito *et al.*, 2010).

Nuestro grupo ha demostrado y caracterizado la inducción de EMT por TGF- β en células hepáticas. Estudios, tanto en hepatocitos fetales como en células de hepatoma, han evidenciado que existe una población de células capaces de resistir al efecto apoptótico inducido por TGF- β (Cain *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1999; Valdes *et al.*, 2002; Caja *et al.*, 2007; Caja *et al.*, 2011b). Estas células sufren una transformación fenotípica hacia células mesenquimales y adquieren marcadores y/o características de progenitores hepáticos, proceso que al menos en hepatocitos está asociado con la producción autocrina de TGF- β que les confiere resistencia a la apoptosis, a través de la secreción de factores mitogénicos y de supervivencia (Valdés *et al.*, 2002; del Castillo *et al.*, 2006, del Castillo *et al.*, 2008a). En hepatocitos adultos el panorama es más complejo, algunos datos indican que estas células no sufren EMT en respuesta al TGF- β , lo que estaría asociado al hecho de que en este modelo el TGF- β no transactiva el EGFR, hecho necesario para los cambios en el citoesqueleto de F-actina (Caja *et al.*, 2007; David *et al.*, 2007), otros autores demuestran lo contrario (Meyer *et al.*, 2013).

La capacidad del TGF- β de inducir EMT en diferentes tipos celulares hepáticos genera un gran interés por su posible relación con la fibrosis hepática y el hecho de que enfermedades crónicas hepáticas que cursan con fibrosis pueden evolucionar a HCC (Majumder *et al.*, 2001; Turley *et al.*, 2008; Dooley *et al.*, 2009; Majumdar *et al.*, 2012; De Craene and Berx, 2013; Zheng and Kang, 2014). En definitiva, se cree que la EMT inducida por TGF- β podría jugar un papel clave en la progresión de

fibrosis, mediante múltiples mecanismos que incluyen la inducción de la proliferación de fibroblastos, la diferenciación de miofibroblastos y la remodelación de la matriz extracelular (Principe *et al.*, 2014); y, consecuentemente, en el desarrollo y/o la progresión tumoral. En este sentido, se ha establecido una correlación entre mayores niveles de TGF- β y estadios avanzados de HCC, que a su vez se correlacionan con una menor respuesta a la terapia, siendo un posible marcador de pronóstico (Fabregat, 2009b). Por otro lado, estudios realizados en tumores hepáticos de rata y en HCC humano correlacionan de forma positiva el aumento de los niveles de TGF- β con la expresión de marcadores de CSCs (Cancer Stem Cells) por parte de una pequeña fracción de células progenitoras hepáticas, lo cual indicaría el papel de TGF- β en la generación de estas células (Wu *et al.*, 2012).

3.1.3. Papel del estrés oxidativo en las actividades biológicas inducidas por TGF- β en el hígado

Los ROS se han implicado en numerosas enfermedades como aterosclerosis (Hsiai and Berliner, 2007), Alzheimer (Shi and Gibson, 2007), algunos tipos de cáncer (Azad *et al.*, 2008) o el proceso de envejecimiento (Lambeth, 2007). Debido a su alta inestabilidad, tienden a reaccionar con otras moléculas iniciando reacciones en cadena que, a su vez, conllevan la formación de nuevos radicales, originando así importantes alteraciones funcionales y estructurales (Figura 10). Sin embargo, niveles controlados de ROS también desempeñan importantes funciones fisiológicas, regulando muchas rutas de señalización. En este sentido, los ROS pueden conducir a la oxidación de proteínas siendo un método de señalización celular presente en múltiples vías de transducción de señales (Martindale and Holbrook, 2002). De este modo, actúan como mensajeros intracelulares a través de la activación de diversas vías como la de las MAPKs (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2001), la PI3K/Akt (Konishi *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001) o la PKC (Majumder *et al.*, 2001) entre otras.

La célula consta de una amplia maquinaria que le permite regular los niveles de ROS (Figura 11), entre las que destacan distintas enzimas antioxidantes, como las SODs (*Superoxide dismutases*), que catalizan la conversión de O_2 en H_2O_2 (Tsan, 1997) y la catalasa, una de las enzimas más eficientes que se conocen (Lledias *et al.*, 1998), encargada de descomponer el H_2O_2 en H_2O y O_2 . Además, hay un grupo de enzimas implicadas en el mantenimiento de los niveles intracelulares de glutatión, que constituye el sistema antioxidante más importante en el hígado (Anderson, 1998). El glutatión actúa como atrapador de radicales libres y como cofactor de enzimas antioxidantes (Pompella *et al.*, 2013). Esto hace que la depleción de

glutación induzca un estrés oxidativo que aumenta la sensibilidad de la célula frente a estímulos apoptóticos (Curtin *et al.*, 2002).

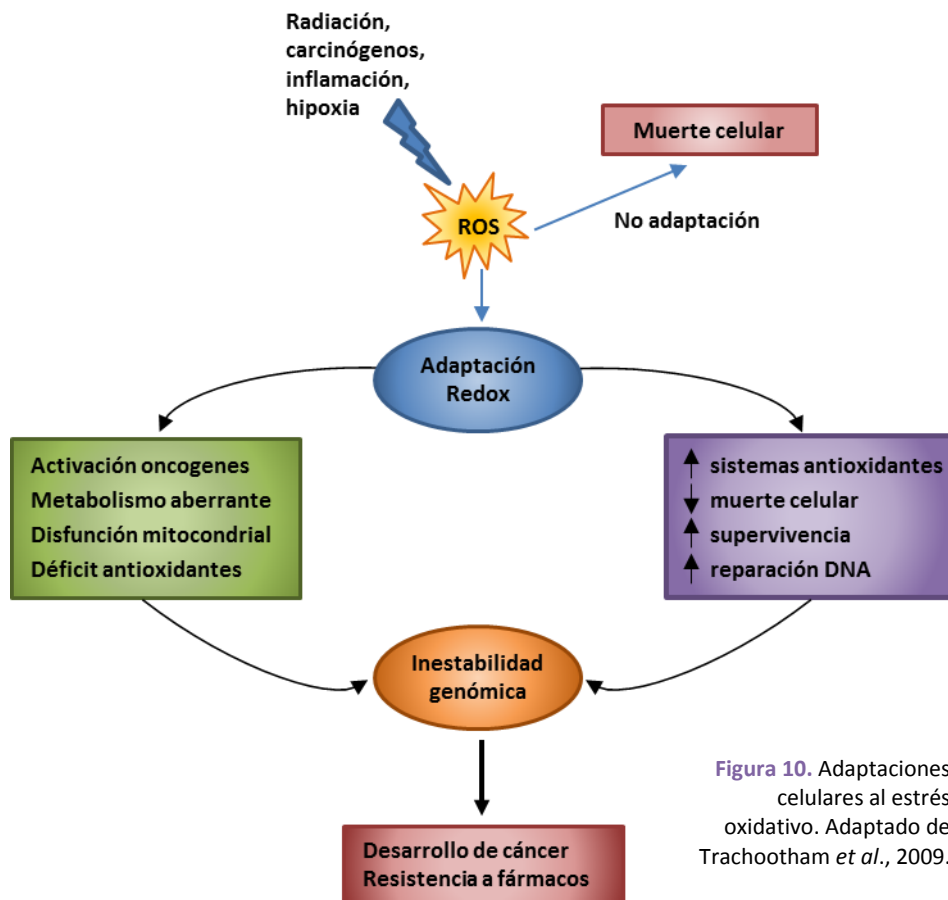


Figura 10. Adaptaciones celulares al estrés oxidativo. Adaptado de Trachootham *et al.*, 2009.

Por otro lado, en la célula también existen mecanismos productores de ROS, como la cadena transportadora de electrones de la mitocondria o como las NOXs, proteínas encargadas de transferir electrones a través de la membrana plasmática. En general, el aceptor de electrones es oxígeno y el producto de la reacción de transferencia es superóxido. Estas enzimas ejercen su función en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas y variaciones de la concentración de calcio. Tienen un papel muy importante en la regulación de funciones biológicas tales como la proliferación celular, la respuesta inmune y la apoptosis (Lambeth, 2007).

INTRODUCCIÓN

La alteración de los niveles de ROS participa en las respuestas celulares al TGF- β en distintos tipos celulares, entre ellos las células hepáticas (Rhyu *et al.*, 2005; Wu, 2006; Cannito *et al.*, 2010). Así, la inducción de ROS media la respuesta apoptótica, como ya se ha mencionado en apartados anteriores, y la EMT (Cannito *et al.*, 2010; Hiraga *et al.*, 2013). Más concretamente, numerosos trabajos apuntan a que el TGF- β es capaz de regular los sistemas que controlan los niveles de ROS para llevar a cabo sus funciones biológicas. Así, el TGF- β disminuye la expresión y/o actividad de algunas enzimas antioxidantes en las células, como ocurre en hepatocitos fetales de rata (Herrera *et al.*, 2004; del Castillo *et al.*, 2008a) y células ovas de ratón (Martínez-Palacian *et al.*, 2013). Además, el TGF- β es capaz de regular los niveles de enzimas productoras de ROS, aumentando por ejemplo los niveles de Nox1, 2 y 4 en hepatocitos fetales (Murillo *et al.*, 2007; Carmona-Cuenca *et al.*, 2008) y de Nox4 en líneas de hepatoma (Caja *et al.*, 2009) y células ovas (Martínez-Palacian *et al.*, 2013), participando en la inducción de apoptosis. El aumento de NOX1 en células de hepatoma confiere resistencia a la apoptosis inducida por TGF- β , siendo NOX1 considerada como una señal de supervivencia (Sancho and Fabregat, 2011). Por otra parte, además de su papel pro-apoptótico, la expresión de NOX4 juega un papel en la inhibición del crecimiento de los hepatocitos en condiciones fisiológicas y en el desarrollo tumoral (Crosas-Molist *et al.*, 2014).

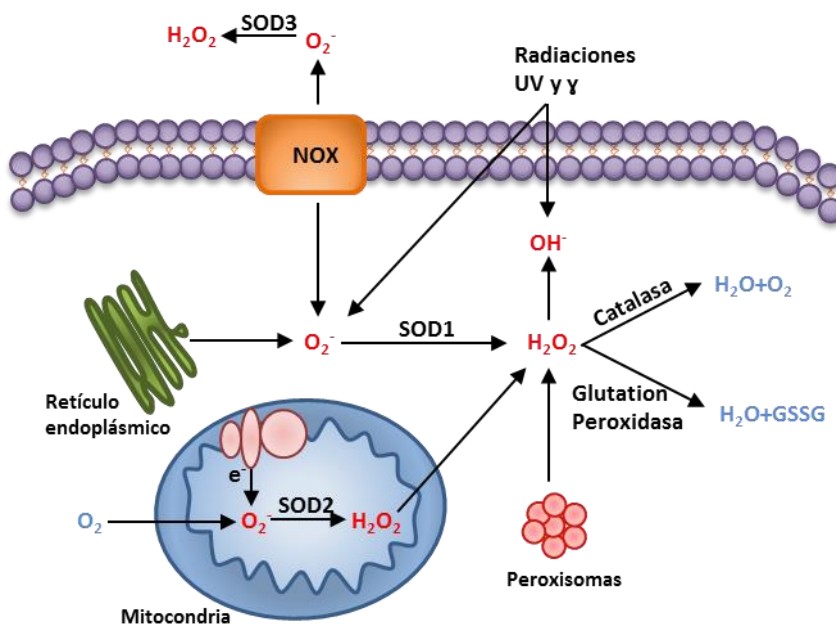


Figura 11. Sistemas de regulación del estado redox celular. Adaptado de Trachootham *et al.*, 2009.

El aumento de las NOXs se ha implicado también en procesos como la fibrosis, poniendo de manifiesto la relación del estrés oxidativo con el proceso de EMT. Así, NOX4 se encuentra elevada en pacientes con fibrosis derivada de hepatitis C, niveles que aumentan con la progresión de la fibrosis (Sancho *et al.*, 2012).

Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de los ROS y, por tanto, del ambiente o metabolismo oxidativo celular en la inducción y modulación de las respuestas celulares al TGF- β , como es el caso de la EMT.

3.1.4. TGF- β como diana terapéutica

Dada la importancia del TGF- β en diversas patologías tumorales incluyendo el HCC, esta vía de señalización ha surgido como una importante diana terapéutica en los procesos tumorales. Así, se ha descrito que alteraciones a diferentes niveles en la vía de TGF- β pueden dar lugar a tumores de diverso origen e influir a distintos niveles en el desarrollo tumoral. Por ello, es importante realizar un profundo estudio de la diana terapéutica elegida con el fin de maximizar la eficacia clínica.

Existen distintas estrategias farmacológicas para intervenir en la vía de TGF- β , como anticuerpos monoclonales neutralizantes, formas solubles de TGF β R2/3, inhibidores de la actividad quinasa de los receptores de TGF- β y oligonucleótidos antisentido. Algunas de estas aproximaciones terapéuticas se encuentran en ensayo clínico, como por ejemplo el compuesto, GC1008, un anticuerpo monoclonal capaz de neutralizar las 3 isoformas de TGF- β y que se encuentra en fase I/II de ensayo clínico en pacientes de cáncer de mama metastásico. Otra herramienta que también se encuentra en ensayo clínico en distintos tipos de cáncer como el carcinoma hepatocelular es el LY2157299, un inhibidor de quinasas que bloquea el sitio de unión de ATP en TGF β R2 (Giannelli *et al.*, 2011).

En respuesta a un daño hepático, se produce TGF- β que participa en el desarrollo de la fibrosis, de tal modo que hay una correlación entre la producción y la progresión de este proceso (Matsuzaki *et al.*, 2014). La inhibición de la señalización de TGF- β en modelos animales conlleva una disminución en el desarrollo de fibrosis (de Gouville *et al.*, 2005). Ya que el TGF- β es un factor de crecimiento implicado en numerosas actividades que afectan a importantes procesos biológicos (embriogénesis, inmunidad, carcinogénesis, inflamación...) resulta incierto el uso de antagonistas de la vía de TGF- β para el tratamiento de la fibrosis en humanos. Sin embargo, el tratamiento del estado inflamatorio que desencadena la fibrosis es uno de los posibles mecanismos indirectos para el tratamiento de ésta (Breitkopf *et al.*, 2005).

3.2. BMP9

Las BMPs constituyen una amplia subfamilia de más de 20 miembros englobada en la superfamilia de factores de crecimiento TGF- β . Originalmente fueron descubiertas por su capacidad de inducir la formación de cartílago y hueso; y la reparación de fracturas, así como por sus efectos en la regulación del crecimiento y diferenciación de condroblastos y osteoblastos *in vitro* (Urist, 1965; Wozney *et al.*, 1988). Sin embargo, ahora se sabe que estas proteínas desempeñan un papel central en el desarrollo temprano y en la regulación de la homeostasis en tejidos adultos, y regulan una gran variedad de procesos celulares, tales como proliferación, apoptosis, diferenciación y migración celular (Sieber *et al.*, 2009; Miyazono *et al.*, 2010).

3.2.1. Señalización mediada por BMP9

BMP9, también conocido como GDF2 es un miembro de la familia de las BMPs. BMP9 se une específicamente a ALK1 con alta afinidad. Aunque originalmente se pensó que la expresión de ALK1 se restringía a las células endoteliales, numerosos estudios prueban que ALK1 se expresa también en diferentes tipos celulares como miofibroblastos, células estrelladas, condrocitos, monocitos y otros (Gonzalez-Nunez *et al.*, 2013). Además, también se ha demostrado que BMP9 se une a ALK2 que tiene un patrón de expresión más ubicua y a los 3 tipos de receptores de tipo II (BMPRII, ActRIIA y ActRIIB) (Brown *et al.*, 2005; Townson *et al.*, 2012) (Figura 12).

La actividad de BMP9 es modulada por algunos co-receptores como endoglina, al cual se une con alta afinidad (Scharpfenecker *et al.*, 2007; Castonguay *et al.*, 2011). Sin embargo, la consecuencia de esta unión es controvertida, aunque la mayoría de los datos bibliográficos indican que endoglina aumenta la señalización de BMP9 (Nolan-Stevaux *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2012).

Además de señalizar vía Smad1,5,8 al igual que el resto de BMPs, algunos autores han descrito que BMP9 es capaz de activar Smad2,3, vía clásicamente

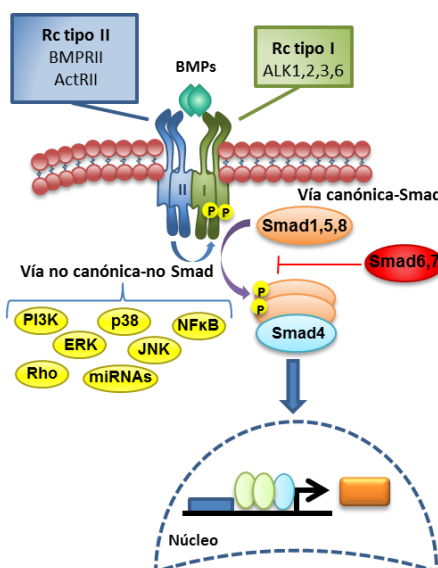


Figura 12. Componentes de la vía de señalización de las BMPs. Adaptado de Herrera *et al.*, 2012.

asociada a TGF- β , en células endoteliales (Scharpfenecker *et al.*, 2007; Sieber *et al.*, 2009). Aunque se sabe que otros miembros de la familia de BMPs activan vías de señalización no-Smads, es poco lo que se sabe a este respecto sobre BMP9. La mayoría de los datos pertenecen a células progenitoras mesenquimales. En este modelo, BMP9 activa JNK en procesos de diferenciación osteogénica (Xu *et al.*, 2012) y, además, activa p38 y ERKs, las cuales parecen modular la señalización vía Smads (Star *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012).

3.2.2. Actividades biológicas de BMP9

BMP9 es capaz de regular diferentes procesos biológicos en varios tipos celulares. La presencia de BMP9 en suero ha hecho que se describa a esta proteína como un factor “quiescente vascular”. Trabajos recientes demuestran la implicación del sistema BMP9/ALK1 en la regulación de la biología de células endoteliales, aunque existe controversia sobre su papel concreto en estas células. Algunos datos en la literatura relacionan a BMP9 con la inhibición de la proliferación y migración de células endoteliales, sin embargo, datos de otros autores muestran un efecto contrario (David *et al.*, 2007; Scharpfenecker *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2012). Por otro lado, BMP9 induce la diferenciación colinérgica de neuronas en el sistema nervioso central (Lopez-Coviella *et al.*, 2000), la diferenciación condrogénica y la formación del hueso *in vivo* (Majumdar *et al.*, 2001) y se ha propuesto como un regulador de la homeostasis de la glucosa (Chen *et al.*, 2003) habiéndose descrito una disminución severa de la expresión de BMP9 en hígados de ratas resistentes a insulina (Caperuto *et al.*, 2008). Además, se ha visto una relación entre la expresión de BMP9 y determinados tipos tumorales como el de cáncer de ovario en el cual actúa como promotor de proliferación celular por un mecanismo dependiente de la vía ALK2/Smad1/Smad4 (Herrera *et al.*, 2009).

3.2.3. Relevancia de BMP9 en hígado

Distintas líneas de investigación han puesto de manifiesto la relevancia de la señalización mediada por BMPs en la función hepática. Varios trabajos han descrito un papel crítico para las BMPs durante el desarrollo del hígado, concretamente en la especificación de las células hepáticas (Rossi *et al.*, 2001). En tejido adulto las BMPs también llevan a cabo la regulación de distintos procesos. Así, BMP6 regula la expresión de la hepcidina, la cual juega un papel central en el control del metabolismo del hierro (Finberg, 2013). El papel de otras BMPs en hígado aún no está muy claro: por ejemplo, BMP7 parece regular la fibrosis hepática, pero hay datos controvertidos, ya que se ha descrito una actividad tanto pro-fibrótica como anti-fibrótica (Kinoshita *et al.*, 2007; Tacke *et al.*, 2007; Chayanupatkul *et al.*, 2009;

Wang *et al.*, 2013). En esta línea, BMP7 se ha propuesto como un promotor de la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial (Sugimoto *et al.*, 2007) mientras que BMP4 actuaría como un inhibidor de este proceso (Do *et al.*, 2012) y un promotor tumoral en HCC (Maegdefrau *et al.*, 2009). Todos estos estudios apuntan al hígado como diana de la acción de las BMPs y de las consecuencias patológicas resultado de la desregulación de la señalización de éstas.

El hígado ha sido propuesto como la fuente de BMP9 circulante que se encuentra en suero tanto bovino como humano a concentraciones bioactivas (David *et al.*, 2008; Herrera and Inman, 2009), hecho que concuerda con que fuera aislado por primera vez en hígado fetal de ratón y que esté presente en hígado de rata (Celeste *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 2000; Bidart *et al.*, 2012). Sin embargo, aún no está claro qué células son las principales productoras de BMP9 en este tejido. Estudios de fraccionamiento del hígado de rata indican que BMP9 es expresado en células no parenquimales como las células de Kupffer, las células estrelladas y las células endoteliales (Miller *et al.*, 2000). Por el contrario, estudios sobre los niveles de mRNA de BMP9 en diferentes subtipos celulares de hígado humano señalan a las células epiteliales biliares intrahepáticas y a los hepatocitos como los mayores productores de esta citoquina (Bidart *et al.*, 2012).

Sobre el papel de BMP9 en hepatocitos al inicio de este trabajo solo se conocía el trabajo de Song y colaboradores (Song *et al.*, 1995). En este estudio se describe que altas concentraciones de BMP9 pueden promover ligeramente la proliferación de hepatocitos de rata en cultivo primario y en la línea celular tumoral humana (HepG2). Más recientemente, el grupo de la Dra. K. Breitkopf Heinlein ha descrito en estudios *in vivo* e *in vitro* que BMP9 es capaz de inducir el proceso de EMT en HCC. Los estudios en modelos celulares relacionan, además, esta transición con la ganancia de capacidad invasiva (Li *et al.*, 2013).

3.2.4. BMPs como diana terapéutica

Para modular la señalización de las BMPs la industria farmacéutica está desarrollando nuevas moléculas con capacidad de inhibición tales como antagonistas recombinantes endógenos, anticuerpos neutralizadores y aproximaciones genéticas como técnicas de silenciamiento.

Dentro de estas herramientas existen unas de espectro más general y otras más específicas de BMP9 y BMP10, ya que se unen a los mismos receptores (David *et al.*, 2007).

Entre los compuestos de espectro general se encuentran compuestos químicos como la dorsomorfina y LDN-193189, que inhiben los receptores de tipo I (ALK2,3,6) bloqueando el dominio de unión a ATP (Cuny *et al.*, 2008). Además, existen compuestos más específicos como anticuerpos o inhibidores biológicos de ALK1, sin olvidar que con esta inhibición también bloquea la actividad de BMP10. La inhibición de ALK1 por procedimientos farmacológicos y genéticos inhibe la angiogénesis en un modelo murino de tumorigénesis, impidiendo el crecimiento y la progresión tumoral. En la actualidad, la industria farmacéutica está llevando a cabo un ensayo clínico en distintos tipos de tumores utilizando una proteína soluble de fusión con la fracción constante de ALK1 (AC-041) que actúa impidiendo la unión del ligando al receptor (Cunha and Pietras, 2011; Bendell *et al.*, 2014).

La capacidad de modular la señalización de las BMPs con este tipo de herramientas es muy prometedora, pero una vez más no hay que olvidar su papel en procesos fisiológicos, la controversia entre los efectos en distintos modelos celulares y el desconocimiento de los efectos a largo plazo del tratamiento con estos compuestos.

4. VÍA DE HGF/c-Met. RELEVANCIA EN EL CONTEXTO HEPÁTICO

El HGF fue identificado a principios de los años 80 como un mitógeno para hepatocitos (Nakamura, 1989). Purificado a partir de ratas hepatectomizadas, este factor era capaz de inducir de forma muy acusada la proliferación de los hepatocitos *in vitro*, por ello fue denominado con este nombre (Nakamura *et al.*, 1984; Russell *et al.*, 1984). De forma independiente, fue descubierto como producto de la secreción de fibroblastos y células de músculo liso y promotor de la motilidad de células epiteliales y denominado SF (*Scatter Factor*) (Stoker *et al.*, 1987). Posteriormente se demostró que ambas moléculas era idénticas (Naldini *et al.*, 1991; Weidner *et al.*, 1991).

4.1. Señalización mediada por HGF/c-Met

La vía HGF/c-Met se inicia con la unión del ligando a su receptor, c-Met, un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa codificado por un proto-oncogén que lleva el mismo nombre. Esta unión favorece la dimerización del mismo y la posterior transfosforilación en residuos de tirosinas (Y1234 y Y1235) en el dominio tirosina quinasa seguida de la fosforilación de las tirosinas Y1349 y 1356 en el dominio C-terminal generándose sitios de anclaje de moléculas adaptadoras y

transductoras que participan en la señalización mediada por c-Met. La unión de estas proteínas, de forma directa o indirecta, favorece la activación de numerosas moléculas y cascadas de señalización como las rutas de PI3K/Akt, Ras/ERKs, JNKs y p38 MAPKs, PLC γ , Stat3, Rac-1, C3G/Rap-1, NF- κ B, Src o Abl, entre otras (Trusolino *et al.*, 2010; Gherardi *et al.*, 2012) (Figura 13).

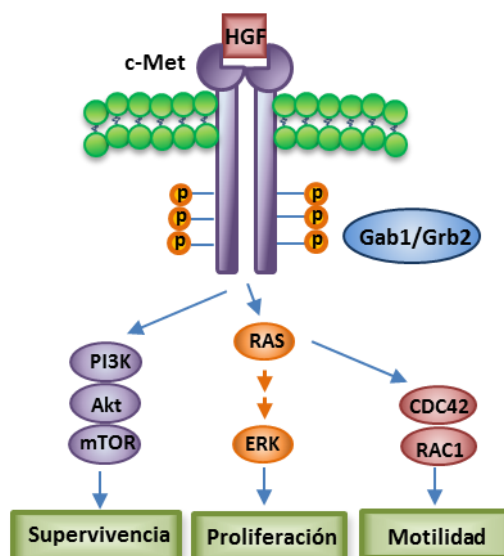


Figura 13. Señalización y respuestas biológicas desencadenadas por la vía HGF/c-Met. Adaptado de (Goyal *et al.*, 2013).

4.2. Actividades biológicas de HGF/c-Met

El HGF es una molécula multifuncional que induce numerosas actividades, como mitogénesis, motogénesis, polarización celular, invasión e inhibe apoptosis (Comoglio and Trusolino, 2002; Birchmeier *et al.*, 2003; Rosario and Birchmeier, 2003; Zhang and Vande Woude, 2003; Tulasne and Foveau, 2008a), constituyendo así una señal esencial en condiciones fisiológicas. Entre los múltiples procesos en los que participa, podemos citar el desarrollo del músculo esquelético controlando la migración de los precursores musculares (Bladt *et al.*, 1995), el desarrollo del sistema nervioso, la remodelación ósea y la angiogénesis (Birchmeier and Gherardi, 1998; Maina *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2011). También estimula la diferenciación y proliferación de células precursoras hematopoyéticas humanas que expresan CD34 así como de células madre embrionarias humanas y células madre neuronales (Schuldiner *et al.*, 2000; Kokuzawa *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2004). En consecuencia, parece que la regulación mediada por HGF es un mecanismo común, crítico en la diferenciación y expansión de las células madre de los diversos órganos.

La capacidad morfogénica es una respuesta única inducida por el HGF y que consiste en la formación, a partir de células epiteliales, de estructuras tridimensionales complejas y ordenadas, entre las que destacan la formación de túbulos ramificados similares a los que se encuentran en órganos epiteliales, tales como el riñón o la glándula mamaria. La respuesta morfogénica es un fenómeno

complejo que comprende a su vez múltiples procesos como cambios en la polaridad y adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y apoptosis (Montesano *et al.*, 1991; Comoglio and Trusolino, 2002; Rosario and Birchmeier, 2003; Karihaloo *et al.*, 2005). Todos estos procesos son necesarios para establecer la arquitectura tisular y confieren al HGF un papel fundamental durante el desarrollo y regeneración de órganos epiteliales (Comoglio and Trusolino, 2002; Birchmeier *et al.*, 2003; Zhang and Vande Woude, 2003; Tulasne and Foveau, 2008a; Trusolino *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2011).

Gracias a la generación de ratones deficiente en HGF o c-Met se ha demostrado inequívocamente que la vía del HGF/c-Met es esencial en el desarrollo. La ausencia de HGF o c-Met en ratones lleva a la muerte del embrión durante el desarrollo, presentando graves alteraciones en la placenta y en el hígado, los órganos que presentan la mayor expresión de HGF durante el desarrollo del ratón (Schmidt *et al.*, 1995; Uehara *et al.*, 1995).

4.3. Relevancia de la vía HGF/c-Met en hígado

El sistema HGF/c-Met regula aspectos esenciales de la biología hepática. Los efectos que ejerce sobre múltiples procesos, tales como proliferación, diferenciación, supervivencia y migración de los hepatocitos, hacen que sea de gran relevancia en la remodelación tisular hepática durante el desarrollo fetal, la regeneración hepática, la resolución de procesos fibróticos y otras alteraciones hepáticas como el cáncer.

El HGF es principalmente conocido por ser un potente mitógeno en hepatocitos tanto *in vivo* como *in vitro* (Nakamura *et al.*, 1984; Russell *et al.*, 1984; Fabregat *et al.*, 1992). Además, esta vía tiene un papel crítico durante el desarrollo hepático como se ha puesto de manifiesto con la generación de ratones deficientes de HGF o c-Met. La ausencia de señalización del eje HGF/c-Met impide el desarrollo embrionario. Estos embriones muestran hígados anormalmente pequeños y una relación masa hepática/masa corporal disminuida debido a la apoptosis masiva de los hepatocitos, demostrando el importante papel anti-apoptótico de HGF en el desarrollo (Bladt *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1995; Uehara *et al.*, 1995).

Asimismo, el HGF ha sido reconocido durante décadas como un factor de crecimiento implicado en la respuesta proliferativa de los hepatocitos durante la regeneración hepática (Michalopoulos, 2007). Así, tras realizar una hepatectomía parcial en ratones se observa aumento de los niveles de HGF (Nakamura *et al.*, 1984). Más relevante es el hecho de que ratones *knock-out* condicionales de c-Met tienen impedida su regeneración vía hepatocitos, indicando el papel esencial de

HGF/c-Met en la regeneración hepática que no puede ser compensado por otras vías (Borowiak *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2004). Estos trabajos evidencian que además de la respuesta proliferativa, esta vía es importante para promover la supervivencia de los hepatocitos, y la remodelación tisular que acompaña al proceso regenerativo (Huh *et al.*, 2004). Esta función pro-regenerativa de la vía es a su vez avalada por numerosos trabajos que han documentado sus efectos anti-fibróticos y protectores en diferentes situaciones de daño hepático y proponen su uso terapéutico (Ogasawara *et al.*, 1993; Kosai *et al.*, 1998; Phaneuf *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2003).

Nuestro grupo, junto con otros, ha contribuido en los últimos años a esclarecer los efectos de la vía de HGF/c-Met en las células progenitoras usando modelos celulares. Se ha evidenciado la actividad mitogénica que ejerce en células ovas de ratón y de rata mediante la sobreexpresión de HGF o bien, por adición de HGF exógeno (Okano *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2004; del Castillo *et al.*, 2008b; Sanchez and Fabregat, 2009). Asimismo, el HGF protege de la apoptosis inducida por ausencia de suero o por TGF- β (del Castillo *et al.*, 2008b; Martinez-Palacian *et al.*, 2013) y la motilidad y la invasión de células progenitoras hepáticas fetales y adultas, a través de distintos mecanismos (Delgado *et al.*, 2009; Suarez-Causado *et al.*, 2015). Todos estos datos son consistentes con datos *in vivo*, que demuestran que la vía de HGF/c-Met también es esencial en la respuesta regenerativa hepática inducida por células progenitoras. Así, usando modelos experimentales de daño hepático crónico se ha visto que la ausencia de c-Met en ratón se correlaciona con daño hepático severo asociado a una profunda reducción de la expansión de la población de células progenitoras y el aumento de la apoptosis. Además, se ve disminuida su capacidad de diferenciación y de migración (Ishikawa *et al.*, 2012).

Por último, existen múltiples alteraciones de esta vía de señalización asociadas al HCC, incluyendo mutaciones activadoras, amplificación y sobreexpresión del ligando y del receptor. Sin embargo, el papel del HGF en carcinogénesis dista mucho de estar claro, ya que se ha descrito tanto un efecto pro-tumoral como anti-tumoral. En modelos animales doble transgénicos *c-myc*/HGF en hígado, se ha visto que la sobreexpresión de HGF tiene un efecto negativo sobre el desarrollo de HCC inducido por TGF- α , lo que le conferiría un efecto supresor (Santoni-Rugiu *et al.*, 1996). Sin embargo, en modelos de inducción química de HCC con DEN, la sobreexpresión de HGF acelera el proceso de hepatocarcinogénesis (Horiguchi *et al.*, 2002). Estudios realizados con animales knock-out condicionales de c-Met en hígado también apoyarían un papel supresor, ya que en modelos de inducción con DEN o CCl(4) la ausencia de la vía de c-Met acelera el proceso de HCC (Takami *et al.*, 2007; Marquardt *et al.*, 2012).

También se ha descrito que la sobreexpresión de c-Met *in vivo* promueve la formación de HCC y la cooperación con otros oncogenes característicos de HCC como c-myc y β -catenina (Goyal *et al.*, 2013). Además, la inhibición de c-Met en distintas líneas de HCC se ha asociado con una disminución de la proliferación, aumento de la apoptosis y pérdida de propiedades de CSCs (Tulasne and Foveau, 2008b; You *et al.*, 2011). Sin duda, el panorama es bastante complejo.

En estudios clínicos, se ha detectado HGF circulante en muchas condiciones patológicas del hígado, incluyendo hepatitis los niveles séricos de HGF correlacionan con una cirrosis más severa (Shiota *et al.*, 1995) y con una menor supervivencia, mayor tamaño del tumor, recurrencia, metástasis y complicaciones post-operatorias en los pacientes de HCC (Wu *et al.*, 2006).

Otros estudios también han descrito la importancia de c-Met en el HCC y han determinado la expresión de un conjunto de genes ligados a la activación de la señalización de c-Met que permiten seleccionar una subpoblación de tumores con un fenotipo más agresivo y con un peor pronóstico para el paciente (Kaposi-Novak *et al.*, 2006).

4.4. HGF/c-Met como diana terapéutica

Aunque los datos en hígado son controvertidos, la activación inapropiada de la vía HGF/c-Met puede contribuir al crecimiento, la supervivencia, angiogénesis y/o metástasis de una amplia variedad de tumores sólidos. Por tanto, de forma general se considera que esta vía tiene un papel importante en el inicio, progresión y mantenimiento tumoral. Además, se cree que estos efectos son debidos, en gran parte, a su capacidad de mediar interacciones entre el tumor y el estroma, una situación similar a las interacciones epitelio-mesénquima que tienen lugar en la morfogénesis y regeneración/reparación tisular (Vande Woude *et al.*, 1997; Comoglio and Trusolino, 2002; Birchmeier *et al.*, 2003; Matsumoto and Nakamura, 2006; Benvenuti and Comoglio, 2007).

Por tanto, la señalización mediada por HGF/c-Met se sitúa como una potencial diana en la terapia anti-tumoral. En la actualidad hay muchos agentes farmacológicos en desarrollo que tienen la inhibición de esta vía como diana terapéutica principal. En este sentido, existen distintas aproximaciones que incluyen entre otros, TKIs (Tyrosine Kinase Inhibitors) de c-Met, anticuerpos neutralizantes de HGF y de c-Met. Algunos ensayos clínicos han mostrado solo beneficios moderados de la inhibición de c-Met en HCC. Esto se ha achacado a varias razones como la heterogeneidad de la enfermedad en su etiología y microambiente o la falta de selectividad y potencia *in vivo* de los TKIs de c-Met (Goyal *et al.*, 2013).

Además, dada la relevancia de la vía HGF/c-Met en la regeneración hepática y el hecho de que la mayoría de los TKIs orales son de metabolismo hepático la ventana terapéutica es muy estrecha. A finales de 2012, cabozantinib, un TKI, fue aprobado por la FDA (US Food and Drug Administration) para el tratamiento de carcinoma medular de tiroides. En la actualidad la aplicación del Cabozantinib está bajo investigación en diferentes tipos de tumores entre los que se incluye el HCC (Parikh *et al.*, 2014).

Además, debido a su implicación en procesos pro-regenerativos, anti-inflamatorios y anti-fibróticos esta vía es también una posible diana terapéutica de diversas enfermedades donde concurren estas alteraciones. Así, el tratamiento con HGF recombinante se está estudiando en enfermedades tales como la fibrosis hepática, la úlcera gástrica o la isquemia cerebral. En concreto, este tratamiento es efectivo en la reducción de la fibrosis y la mejora de la función del tejido en modelos de enfermedades, incluyendo la cirrosis hepática, enfermedad renal crónica, cardiomiopatía dilatada y fibrosis pulmonar (Matsumoto *et al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES

1. RESULTADOS ANTERIORES DEL GRUPO EN RELACIÓN A BMP9 Y SU IMPLICACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS HEPÁTICAS Y RELEVANCIA EN HEPATOCARCINOGENÉISIS

Los estudios realizados en relación a la implicación de BMP9 en la biología de las células hepáticas son los primeros desarrollados en el grupo, correspondiendo a una nueva línea de investigación abierta con este proyecto.

Tomamos como base para nuestro modelo los resultados obtenidos por la Dra. Herrera en el laboratorio del Dr. Inman en un modelo de células de cáncer de ovario (Herrera et al., 2009). En este trabajo se muestra como BMP9 induce proliferación en células epiteliales de la superficie del ovario inmortalizadas (OSE, "Ovarian Surface Epithelial") y en células de cáncer de ovario a través del eje ALK2/Smad1/Smad4. Además, algunas líneas de cáncer de ovario presentan una producción autocrina de BMP9 que sustenta su proliferación. Esto, junto con el análisis inmunohistoquímico de la expresión de BMP9 en un *array* de tejidos procedente de cáncer de ovario que muestra que el 25% de las muestras de cáncer de ovario de origen epitelial expresan BMP9, a diferencia de las células OSE, señalan a BMP9 como una nueva diana terapéutica en cáncer de ovario.

2. RESULTADOS ANTERIORES DEL GRUPO EN RELACIÓN AL TGF- β Y SU IMPLICACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS HEPÁTICAS Y RELEVANCIA EN HEPATOCARCINOGENÉISIS Y REGENERACIÓN

Nuestro grupo lleva una larga trayectoria en el estudio de los mecanismos que regulan los procesos de proliferación, diferenciación y muerte en las células hepáticas centrándose fundamentalmente en el análisis del papel regulador del TGF- β y la interacción con otras vías de señalización, como la de HGF/c-Met y la de los ligandos del EGFR.

Así, se ha descrito que en hepatocitos fetales primarios de rata, el TGF- β a dosis bajas ejerce un efecto inhibitor del crecimiento (Sanchez et al., 1995), mientras que a dosis más altas induce un proceso de muerte celular por apoptosis (Sanchez et al., 1996). En estas condiciones, el EGF, pero no el HGF, ejerce un papel

protector (Fabregat et al., 1996; Fabregat et al., 2000). Sin embargo, una proporción de estos hepatocitos sobrevive a los efectos apoptóticos del TGF- β y sufren una transformación fenotípica hacia células mesenquimales, es decir, un proceso de EMT (Sanchez et al., 1999). Tras esta transformación, estas células mantienen la respuesta a TGF- β en términos de activación de Smads e inhibición del crecimiento, pero presentan una activación de la vía de supervivencia PI3K/Akt (Valdes et al., 2002; Valdes et al., 2004). Estudios más profundos sobre los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a muerte revelaron el establecimiento de una señalización autocrina de supervivencia dependiente de TGF- β y mediada a través de la expresión de ligandos del EGFR y la consiguiente activación de este receptor (del Castillo et al., 2006).

Además de sufrir los cambios característicos de un proceso de EMT, estas células adquieren la expresión de marcadores de células madre/progenitoras como OV-6. Así, se hacen bipotenciales y expresan marcadores tanto de colangiocitos como de hepatocitos (Valdés et al., 2002; del Castillo et al., 2008a). Al mismo tiempo, tras la EMT, estas células presentan un mayor contenido de ROS acompañado de profundos cambios en la expresión de genes del metabolismo oxidativo: pérdida de expresión de Nox2 e inducción de Nox4; disminución de los niveles de SOD2 y catalasa y fuerte aumento de los niveles de γ -GCS, sugiriendo un papel principal para este sistema antioxidante de estas células (del Castillo et al., 2008a).

En los últimos años se ha abierto una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio, con el objeto de estudiar la relevancia de la señalización de HGF/c-Met y sus interacciones con otras vías, como la del EGFR y el TGF- β , en la biología de las células progenitoras hepáticas. Para ello, se generaron líneas celulares clonales a partir de células ovals inducidas por tratamiento con DDC en un modelo de ratón *knockout* condicional de c-Met desarrollado en el laboratorio del Dr. S.S. Thorgeirsson (Huh et al., 2004). Una vez aisladas las células ovals y establecidas en cultivo, utilizando el sistema de modificación genética Cre-loxP y la consiguiente recombinación mediada por adenovirus, se obtuvieron células ovals que expresan una forma funcional (células Met^{fix/fix}) o no funcional (células Met^{-/-}) de c-Met (**Figura 14**). Las líneas de células ovals obtenidas fueron caracterizadas, demostrándose un fenotipo inmaduro bipotencial propio de las células ovals. También se realizó su validación mediante el análisis de respuesta a HGF y se observó que no se induce fosforilación de c-Met ni activación de dianas de esta vía como las ERKs o Akt. Además, no responden a éste en términos de proliferación lo que constituye la validación funcional del sistema. Estos datos reflejaban la solidez del modelo obtenido constituyendo una herramienta de gran utilidad para el estudio de la señalización del eje HGF/c-Met en las células ovals (del Castillo et al.,

2008b). Este trabajo permitió describir la existencia de una señalización autocrina vía HGF/c-Met con una importante actividad anti-apoptótica frente a la ausencia de suero o el tratamiento con TGF- β , poniendo de manifiesto el papel crítico de c-Met en la supervivencia de las células ovales.

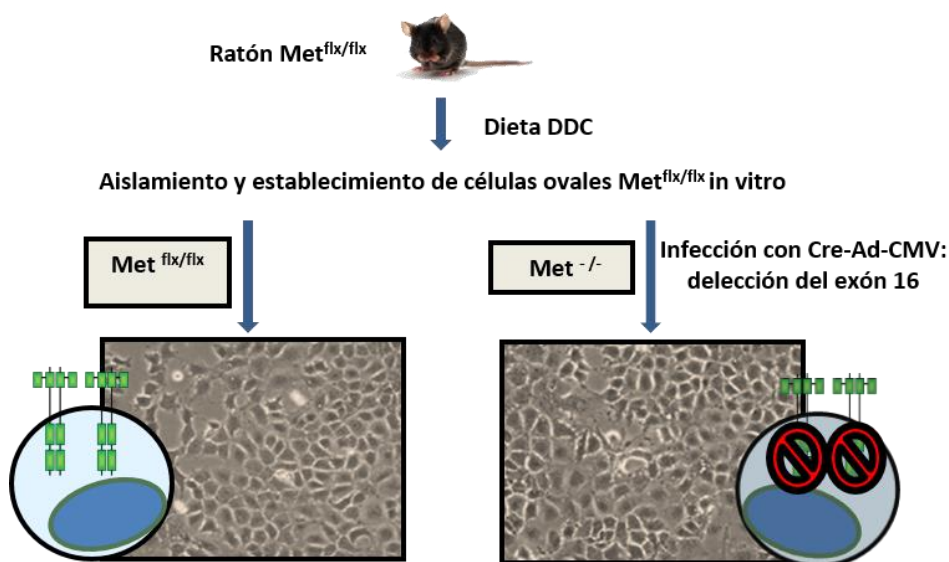


Figura 14. Esquema del protocolo seguido para la obtención de las líneas de células ovales.

Los trabajos posteriores se enfocaron en la caracterización de la apoptosis inducida por TGF- β en células ovales y de los mecanismos que median el papel protector de la señalización autocrina de HGF/c-Met. Así, los resultados obtenidos ponían de manifiesto que el TGF- β induce una apoptosis mitocondrial, en la que se produce un marcado aumento de los niveles de Bim y Bmf, miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl2. La respuesta apoptótica es dependiente de la inducción de un proceso de estrés oxidativo (Figura 15A), con aumento de la producción de ROS, disminución de la expresión de enzimas antioxidantes como SOD2, CAT y γ -GCS (Figura 15B) y aumento en los niveles de enzimas productoras de ROS como Nox4 (Figura 15C). Esta respuesta se encuentra amplificada en aquellas células que carecen de un receptor c-Met funcional, indicando de nuevo la relevancia de la vía HGF en supervivencia.

Por otro lado, la inhibición de PI3K (tanto farmacológica como la mediada por siRNA) aumenta la sensibilidad de las células $Met^{flx/flx}$ al tratamiento con TGF- β alcanzando unos niveles de estrés oxidativo y apoptosis similares a los de las células $Met^{-/-}$ (Figura 15D) lo que sugiere la existencia de un eje c-Met/PI3K/Akt con

actividad anti-apoptótica y anti-oxidante que hace frente a los efectos de TGF- β (Martinez-Palacian *et al.*, 2013).

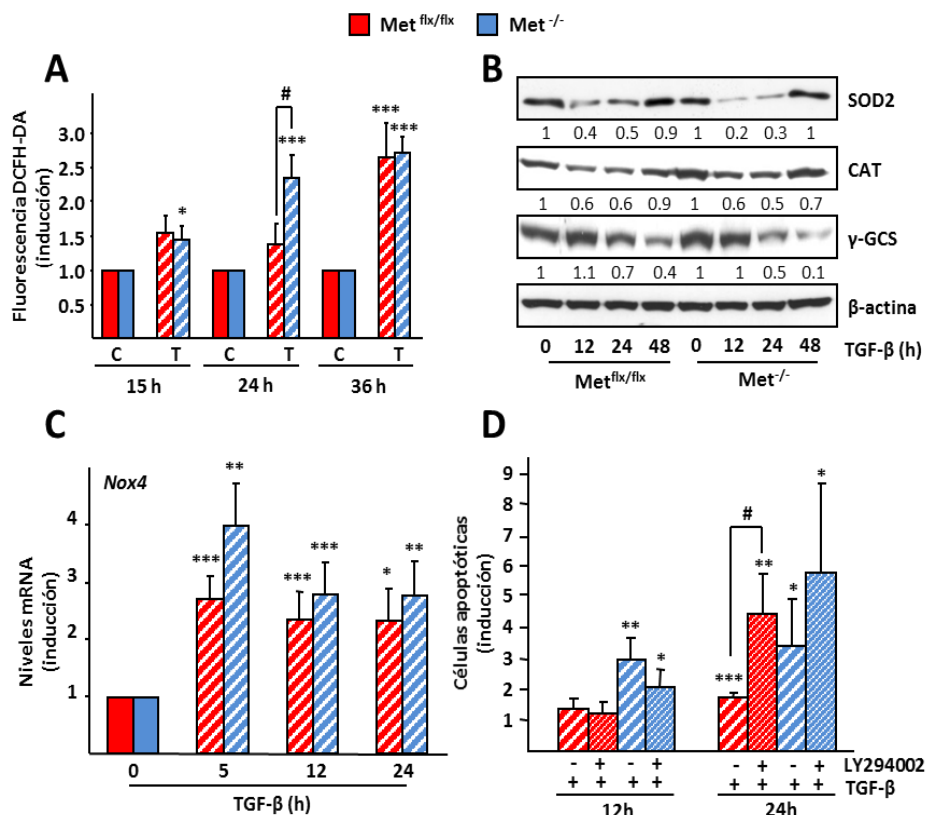


Figura 15. Papel del estrés oxidativo y la vía PI3K/Akt en la apoptosis inducida por TGF- β en las células ovas. **A-C.** Las células ovas, Met^{flx/flx} y Met^{-/-} fueron privadas de suero durante 2-4 horas y, posteriormente, tratadas en ausencia (C) o presencia de TGF- β (T) (1 ng/ml) durante distintos períodos de tiempo. **A.** Medida de fluorescencia de DCFH-DA (5 mM). Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **B.** Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes y las membranas se hibridaron con los anticuerpos indicados. Se muestra β -actina como control de carga. **C.** Análisis mediante RTPCR cuantitativa de los niveles de expresión de mRNA de Nox4 normalizados con Gusb. Datos de 4 experimentos independientes (media \pm S.E.M.). **D.** Las células ovas, Met^{flx/flx} y Met^{-/-}, fueron privadas de suero durante 2-4 horas y, a continuación, tratadas con TGF- β (1 ng/ml) y ausencia o presencia de LY294002 (7,5 mM). Análisis del número de células apoptóticas (anexina +/ yoduro de propidio -). Datos de 4 experimentos independientes (media \pm S.E.M.). * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

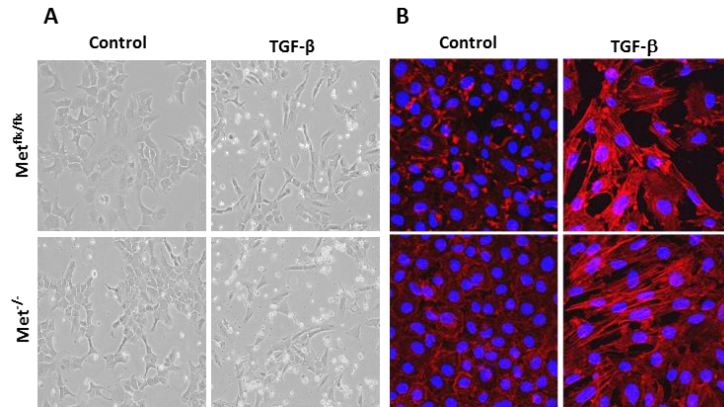


Figura 16. Las células ovals que sobreviven al efecto apoptótico del TGF- β manifiestan un cambio fenotípico y presentan una reorganización de los filamentos de actina. (A) Fotografías tomadas con el microscopio de contraste de fases de células ovals $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$ tratadas o no con TGF- β 1 ng/ml en ausencia de suero durante 48 horas. **(B)** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal del citoesqueleto de actina, usando faloidina conjugada con rodamina (rojo), en células ovals $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$ tratadas o no con TGF- β 1 ng/ml en ausencia de suero durante 48 horas. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

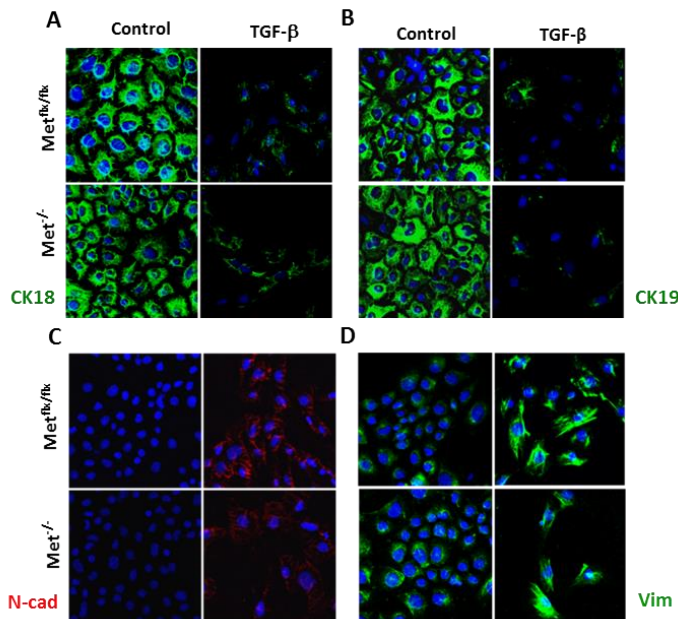


Figura 17. El TGF- β induce en células ovals $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$ pérdida de marcadores epiteliales y ganancia de marcadores mesenquimales. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a la expresión de los marcadores epiteliales **(A)** CK18 y **(B)** CK19 y de los marcadores mesenquimales **(C)** N-cadherina y **(D)** vimentina, tras tinción inmunocitoquímica de células ovals en ausencia de suero y tratadas o no con TGF- β 1 ng/ml durante 48 horas. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

Sin embargo, a pesar del potente efecto apoptótico que ejerce el TGF- β , no todas las células ovasles mueren. Al igual que vimos previamente en hepatocitos, una parte de la población celular es capaz de resistir a esta acción y sufre un cambio fenotípico (**Figura 16A**) acompañado por una remodelación en el citoesqueleto de actina como se observa al teñir con faloidina (**Figura 16B**). Además, se observa pérdida de marcadores epiteliales como las CK18 y 19 y adquisición de marcadores mesenquimales como N-cadherina y vimentina (**Figura 17**). Por último, el análisis del perfil de expresión génica de las células evidencia una disminución de los niveles de expresión de E-cadherina y un aumento de factores de transcripción claves en la mediación de un proceso de EMT, como Snail, Zeb1 y Zeb2 (**Figura 18**).

Todos estos resultados, en su conjunto, demostraban la inducción de un proceso de EMT por TGF- β en células ovasles. Asimismo, sugieren que la señalización de c-Met no juega un papel crítico durante este proceso, ya que las células ovasles Met^{-/-} presentan un fenotipo similar al de las células Met^{flx/flx}.

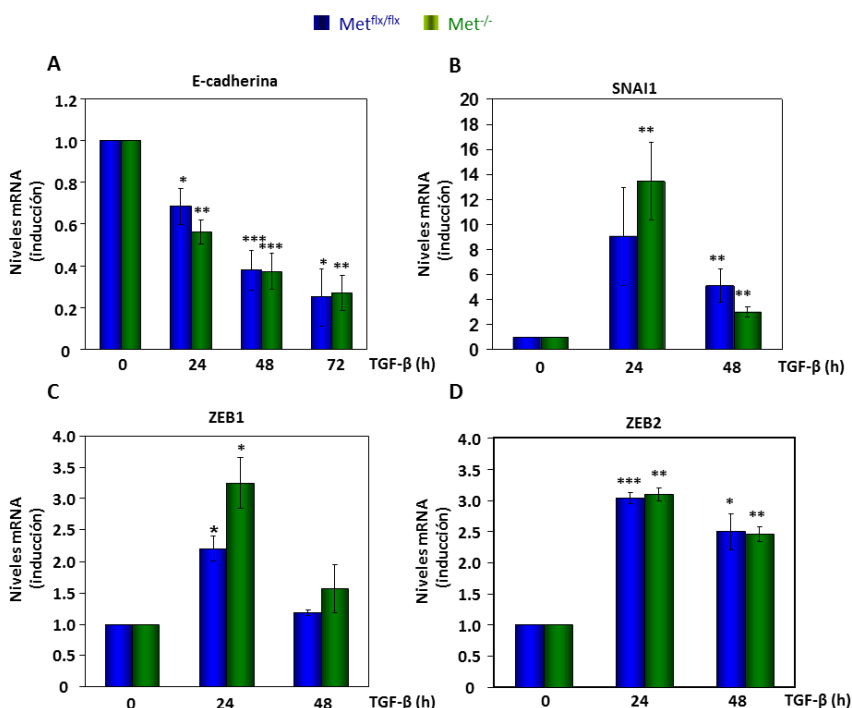


Figura 18. TGF- β induce la expresión de factores de transcripción implicados en EMT en células ovasles Met^{flx/flx} y Met^{-/-}. Las células ovasles se cultivaron en ausencia de suero y se trataron con TGF- β (1 ng/ml) durante los tiempos indicados. Análisis de los niveles de mRNA de (A) E-Cadherina, (B) SNAI1, (C) ZEB1 y (D) ZEB2 mediante RT-PCR cuantitativa. Se representan la media \pm S.E.M. de dos experimentos independientes, realizados por triplicado. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

3. OBJETIVOS

La superfamilia de TGF- β está implicada en numerosos procesos biológicos, entre ellos el desarrollo y progresión tumoral. Con el fin último de avanzar en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares implicados en los procesos de hepatocarcinogénesis y regeneración hepática, en este trabajo nos propusimos estudiar la relevancia de dos miembros de esta superfamilia en la biología de las células hepáticas, más concretamente:

- Estudio del papel de BMP9 en la fisiología/patología de las células hepáticas mediante estudios *in vitro*.
- Estudiar el papel de la vía de TGF- β y su interacción con la vía de HGF en la inducción de un proceso de EMT en células progenitoras hepáticas; así como su relevancia para el destino de estas células.

Para ello, nos planteamos los siguientes **objetivos concretos**:

1. Estudio del papel de BMP9 en la proliferación y supervivencia de distintas células hepáticas, incluyendo líneas celulares de cáncer de hígado y células no transformadas en distintos estadios de desarrollo.
2. Análisis de los mecanismos de acción y las vías de señalización implicadas en el efecto inducido por BMP9 en células de tumor hepático.
3. Establecimiento de líneas estables de células ovals tras sufrir EMT por tratamiento con TGF- β (T β T-OC). Análisis del papel de la señalización de c-Met durante el proceso.
4. Caracterización fenotípica y funcional de las células T β T-OC:
 - 4.1. Análisis de la capacidad proliferativa, de supervivencia e invasión de las células T β T-OC en comparación con líneas de células ovals.
 - 4.2. Análisis de posibles cambios a nivel del metabolismo oxidativo y de la función mitocondrial en las células T β T-OC en comparación con líneas de células ovals.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELOS CELULARES

Para realizar este trabajo se han utilizado varios modelos celulares que reflejan distintos estadios del desarrollo hepático así como diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.

1.1. Líneas celulares

1.1.1. Células progenitoras hepáticas o células ovals

Las líneas de células ovals, $\text{Met}^{\text{fix/fix}}$ y $\text{Met}^{-/-}$ proceden de un modelo de ratón *knockout* condicional para c-Met generado mediante el sistema de modificación genética Cre-loxP (Dr. Thorgeirsson NIH, Bethesda, EE.UU.). Estos ratones presentan secuencias loxP flanqueando el exón 16, que codifica para un dominio de unión a ATP de la región tirosina quinasa de c-Met. La eliminación de esta región mediante la actividad de la Cre-recombinasa conduce a la expresión de un receptor que carece de actividad tirosina quinasa, dejando así de ser funcional.

La activación y expansión de las células ovals $\text{Met}^{\text{fix/fix}}$ se realizó *in vivo* en un modelo de daño hepático crónico basado en el tratamiento con 0,1% de DDC (Preisegger *et al.*, 1999). La generación de las líneas de células $\text{Met}^{-/-}$ se realizó a partir de las células $\text{Met}^{\text{fix/fix}}$, mediante la infección con un adenovirus capaz de expresar la Cre-Recombinasa bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) (Ad-CMV-Cre) (Vector Biolabs). Una vez aisladas y subclonadas estas células fueron validadas y caracterizadas fenotípica y funcionalmente como se describe con detalle en trabajos previos de nuestro grupo (del Castillo *et al.*, 2008a).

Las células ovals, $\text{Met}^{\text{fix/fix}}$ y $\text{Met}^{-/-}$, transformadas con el oncogén Ras fueron generadas en colaboración con el Dr. W. Mikulits (Universidad de Viena, Austria) mediante transmisión estable con lentivirus de la construcción v-Ha-Ras junto con una construcción vacía con GFP que permitió la selección de las células (Fischer *et al.*, 2005).

1.1.2. Hepatocitos neonatales y adultos

La línea de hepatocitos neonatales inmortalizados de ratón se generó en el laboratorio de la Dra. Ángela M. Martínez Valverde (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2007) a partir de hígados de ratones de 3-5 días de vida.

Los cultivos primarios de hepatocitos adultos de ratón se realizaron siguiendo el método de perfusión para la obtención de estas células (Kao *et al.*, 1996). Según este método, se realizó en ratones macho de 2-3 meses de edad una doble

perfusión del hígado, en primer lugar con una solución salina suplementada con Hepes 10 mM y 0,2 mM de EGTA durante 5 minutos y posteriormente durante 10-15 minutos con una solución compuesta por medio William's E, Hepes 10 mM y 0,03% de colagenasa tipo I (125 U/mg, Worthington). A continuación, se extrajo el hígado y se disgregó totalmente mediante pipeteo en una placa de cultivo en medio DMEM:F12 suplementado con piruvato sódico 100 mM, Hepes 1 M, glutamina 200 mM, 7,5% bicarbonato sódico, 1 M glucosa, 3% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma), antibióticos y 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Lonza) en condiciones de esterilidad (en cabina de flujo laminar). Posteriormente, se filtró con un filtro celular de 70 μ m (BD). La porción de hepatocitos viables se seleccionó mediante centrifugación en gradiente de densidad de Percoll y se sembró en placas tratadas con colágeno I.

Los hepatocitos adultos inmortalizados de origen humano (THLE3) fueron adquiridos en la ATCC (American Type Culture Collection). El cultivo de esta línea se realizó en platos que habían sido tratados con una solución de 1 mg/ml fibronectina, 0,03 mg/ml colágeno I y 0,01 mg/ml BSA. Las células se sembraron en medio de cultivo BEBM (Lonza) suplementado con BEGM Bullet Kit (Lonza, ref.CC-3170) compuesto por epinefrina, hidrocortisona, triyotironina, ácido retinoico, insulina, EGF, gentamicina, transferrina y extracto de pituitaria bovina.

1.1.3. Líneas celulares de tumor hepático

Las líneas celulares HepG2, Huh7, Hep3B, Sk-Hep1 y PLC/PRF/5 fueron obtenidas de la ECACC (European Collection of Cell Cultures).

Las células HepG2BRA son células HepG2 que expresan de manera estable un plásmido que contiene elementos de respuesta a BMPs del promotor de Id1 fusionado con un gen reportero luciferasa. Estas células fueron cedidas por el Dr. Rifkin del Centro Médico Langone de la Universidad de Nueva York.

1.2. Condiciones de cultivo celular

El cultivo de estas células se realizó en el medio indicado para cada tipo celular, suplementado con HEPES 20 mM (pH 7,4), 10% de FBS y los requerimientos específicos para cada tipo celular (**Tabla 1**), además de penicilina 120 μ g/ml, estreptomycin 100 μ g/ml (Sigma) y anfotericina B 2,5 μ g/ml (Sigma). A este medio me referiré como medio completo.

Las condiciones de cultivo eran controladas en términos de temperatura (37°C), humedad (80%) y atmósfera de CO₂ (5%). El medio se renovó completamente cada 48-72 horas y las células se tripsinizaron y subcultivaron cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	MEDIO DE CULTIVO	SUPLEMENTOS ESPECIALES
HepG2 PLC/PRF5	Tumor hepático	DMEM	No
Hep3B		MEM	
Sk-Hep1 Huh7			
HepG2-BRA	HepG2 que expresan establemente una construcción con un elemento de respuesta a BMP (BRE) unido a un gen reportero con actividad luciferasa	DMEM	Neomicina (700 µg/ml)
Hepatocitos neonatales	Ratones neonatos (3-5 días de edad)	DMEM	No
Hepatocitos primarios adultos de ratón	Ratones adultos (2-3 meses de edad)	DMEM:F12	Piruvato sódico (5mM), Hepes (10mM), glutamina (2mM), carbonato sódico (0,05%) y glucosa (6mM)
Células ovals	Células progenitoras extraídas de ratón adulto (2-3 meses de edad)	DMEM	No
THLE3	Hepatocitos adultos inmortalizados humanos	BEBM	Kit BEGM (BPE, insulin, HC, GA-1000, retinoic acid, transferrin, triiodothyronine, epinephrine, hEGF). Superficie de cultivo con medio de coacción: fibronectina (0,01 mg/ml), colágeno tipo I (0,03 mg/ml) y BSA (0,01 mg/ml)

Tabla 1. Líneas celulares.

Para el desarrollo de cada experimento las células fueron sembradas en medio completo, en distintas densidades y superficies en función del experimento. Transcurridas 8-15 horas se cambió a medio 0-0,1% FBS, condición en la que se desarrollan los experimentos, salvo en las situaciones indicadas.

Para criopreservar las células, éstas fueron tripsinizadas y una vez parada la acción de la tripsina con medio con suero se centrifugaron (5 min, 1.300 rpm), para ser resuspendidas en FBS suplementado con DMSO (dimetilsulfoxido) al 10% (v/v), e introducidas en criotubos (Nunc). El proceso de congelación fue llevado a cabo de forma lenta mediante el uso de una caja de criopreservación de polietileno bañado por isopropanol (Mr. Frosty, Thermo Scientific), que era introducido en un congelador a -80°C. Posteriormente los criotubos fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido (-190°C). La descongelación fue realizada de forma rápida, pasando los criotubos directamente a un baño a 37°C. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con abundante medio de cultivo completo.

2. FACTORES DE CRECIMIENTO E INHIBIDORES UTILIZADOS

Los factores de crecimiento e inhibidores utilizados en este trabajo aparecen resumidos en las siguientes tablas (Tabla 2 y 3, respectivamente). 3-15 horas antes de realizar los tratamientos se cambió el medio de cultivo a uno sin suero. Los inhibidores se añadieron 1 hora antes que los factores de crecimiento y en los tratamientos de larga duración los inhibidores y factores de crecimiento fueron renovados cada 48 horas.

FACTORES DE CRECIMIENTO	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL
BMP9	1-10 nM	R&D Systems
EGF	40 ng/ml	Serono Laboratories
IGF1	10 nM	Calbiochem
INSULINA	100 nM	Sigma
TGF-β	1 ng/ml	Calbiochem

Tabla 2. Factores de crecimiento.

INHIBIDORES	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL
ALK1ecd	16 F.M.E.	R&D Systems
DORSOMORFINA	1 μ M	Calbiochem
LDN193189	100 nM	Miltenyi Biotec
LY294002	7,5 μ M	Calbiochem
SB203580	10 μ M	Calbiochem
WORTMANINA	80 nM	Sigma

Tabla 3. Inhibidores.

3. AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO

Para el genotipado de las líneas de células ovas el aislamiento del DNA genómico se realizó mediante una extracción fenol:cloroformo clásica.

En primer lugar, las células se lavaban con PBS (Phosphate Buffered Saline) y recogidas mediante rascado o tripsinización. Posteriormente, se centrifugaban a 2000 rpm durante 5 minutos y se resuspendían en 0,5 ml del tampón de lisis (NaCl 200 mM, Tris-HCl pH 8,5 100 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,2% y Proteinasa K 100 μ g/ml) durante 2 horas a 55°C en agitación.

A continuación, se añadía al lisado el mismo volumen de fenol (0,5 ml), se homogenizaba y centrifugaba durante 2 minutos a 13.000 rpm. Así, se formaban 2 fases y se recogía en un nuevo tubo la fase superior correspondiente a los ácidos nucleicos. A continuación, se añadía el mismo volumen de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se homogenizaba, se centrifugaba de nuevo. La fase superior se transfería a un nuevo tubo. Posteriormente, se realizaba la misma operación sólo con cloroformo con el fin de eliminar bien los restos de fenol. La fase superior, que contiene el DNA, se recogía en un nuevo tubo. Finalmente, se precipitaba el DNA genómico con 2-3 volúmenes de etanol y 1/10 de volumen de acetato sódico 3M pH 5,2, y se centrifugaba durante 2 minutos a 13.000 rpm. A continuación se lavaba con etanol al 70%, se centrifugaba de nuevo, se eliminaba totalmente el etanol y se resuspendía en agua libre de enzimas que puedan degradar el DNA (DNAsas).

A continuación se llevó a cabo la reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con los oligos específicos.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR (Polymerase Chain Reaction)

4.1. Aislamiento de RNA

El RNA se aisló siguiendo el protocolo de RNeasy mini Kit (Qiagen), incluyendo el tratamiento con DNAsa (Qiagen) para evitar la presencia de DNA genómico. La valoración de la concentración y pureza del RNA extraído se realizó mediante lectura espectrofotométrica a 260, 280 y 310 nm. A partir de estas medidas se calculó la concentración del ácido nucleico (A260nm) y de proteínas (A280 nm) en la muestra, por lo que la relación entre ambas absorbancias (A260/A280) daba una idea del grado de contaminación con proteínas que tenían nuestras muestras, siendo 1,8-2 el intervalo que indica un buen grado de pureza del RNA. La lectura a 310 nm se corresponde a la absorbancia debida a otras impurezas. La valoración cuantitativa del RNA se realizó teniendo en cuenta que una unidad de D.O. a 260 nm se corresponde con 40 µg/ml de RNA (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras se guardaron a -80°C hasta su procesamiento posterior.

4.2. Síntesis de cDNA (RT, retrotranscripción)

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA, en dos reacciones consecutivas. En la primera reacción las muestras se calentaban a 65°C durante 5 minutos en presencia de 0,25 µg de cebador poli dT (Roche) y dNTPs 0,5 mM (Invitrogen), con el fin de eliminar las posibles estructuras secundarias formadas en el RNA. A continuación, se incubó a 50°C durante 1 hora en presencia de 200 unidades de retrotranscriptasa (Superscript III RNase H Reverse Transcriptase, Invitrogen), DTT 5 mM y 40 unidades de inhibidor de RNAsas (RNAsin, Promega) en un volumen final de 20 µl. La reacción se detenía inactivando la enzima a 70°C durante 15 minutos. Tras la obtención del cDNA, se diluía 1:10 con agua libre de nucleasas y se guardaba a -20°C. Además, se realizó un control (-RT) para determinar la posible presencia de DNA genómico en las muestras, con todos los componentes de la mezcla de retrotranscripción a excepción de la enzima.

4.3. RT-PCR semicuantitativa

La RT-PCR semicuantitativa se realizó a partir de 2 µl de la mezcla de reacción que contenía el cDNA o el DNA genómico, en presencia de los cebadores específicos para los genes diana (1 µM, Sigma) (Tabla 4), dNTPs (100 µM, Invitrogen), MgCl₂

(1,5 mM, Biogen) y 1 unidad de la polimerasa Biotaq (Biogen). Las condiciones de la reacción de PCR fueron:

- 1) 5 minutos a 95°C.
- 2) 30 ciclos de tres etapas cada uno:
 - 0,5-1 minuto a 94°C.
 - 30 segundos a la temperatura de fusión (T_m) apropiada para cada par de cebadores (T_m indicada en la [Tabla 4](#)).
 - 0,5-1 min a 72°C.
- 3) 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1-1,5%, en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM; 0,1% Ácido acético glacial; EDTA 1 mM).

GEN	Oligo 5'-3' (forward)	Oligo 3'-5' (reverse)	T _m
E-CADHERINA	CGTGATGAAGGTCTCAGCC	ATGGGGGCTTCATTCAC	64
SNAIL	GCAGCTGGCCAGGCTCTCGGTGGC	GTAGCTGGGTCAGCGAGGGCCTCC	65
18-S	GCGAAAGCATTTGCCAAGAA	CATCACAGACCTGTTATTGC	58

Tabla 4. Cebadores utilizados en RT-PCR semicuantitativa.

4.4. RT-PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos, siendo el volumen total de reacción por pocillo de 10 µl. La mezcla de reacción estaba compuesta por 5 µl de SYBR Green Master Mix 2x (Roche); 1,3 µl de agua libre de nucleasas; 1,2 µl de mezcla de oligos (10 µM) y 2,5 µl de cDNA. El desarrollo de la reacción de PCR se realizó en un equipo ABI Prism 7900 HT Fast-Real-Time de Applied Biosystems de los servicios de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Las secuencias de los oligos empleados se encuentran indicadas en la [tabla 5](#). La expresión de *Gusb* se empleó como normalizador interno. Para cada condición del experimento los datos de Ct (*Cycle threshold*) de cada gen se corrigieron con los valores de Ct del normalizador interno, obteniéndose así el valor de ΔCt . Éste, a su vez, se expresó en relación a los valores de ΔCt de un control no tratado, obteniéndose un nuevo valor, el $\Delta\Delta Ct$, el cual expresado en escala no logarítmica mediante la transformación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proporciona el número de veces de inducción de la expresión del gen en estudio respecto a un control no tratado.

GEN	OLIGO 5'- 3' (forward)	OLIGO 3'- 5' (reverse)	ESPECIE
BAX	TGCTTCAGGGTTTCATCCAG	GGCGGCAATCATCCTCTG	Humano
BCL-xl	TAGAGTTCCACAAAAGTATC	CATGGCAGCAGTAAAGCAAG	Humano
BIM	AACCACTATCTCAGTGAAT	GGTCTTCGGCTGCTTGGTAA	Humano
BMP9	AGCCTGGGAGGGTTGTTGGGAT	TGTGCTCCTCTGGTCACTGCT	Humano
E-CADHERINA	CAGCCTTCTTTTCGGAAGACT	GGTAGACAGCTCCCTATGACTG	Ratón
N-CADHERINA	ACTGGGTCATCCCGCAATCA	TGAAGATGCCCCTTGGAGGCTG	Ratón
CATALASA	GTCACCGGCACATGAATGGCTA	TGCCCTGGTCGGTCTTGTAAATGG	Ratón
CD133	CTGGGATTGTTGGCCCTCTC	AGGGCAATCTCCTTGAATCA	Ratón
CD44	GGCCACCATTGCCTCAACTGT	TGCACTCGTTGTGGGCTCCTG	Ratón
EpCAM	ACCTGAGAGTGAACGGAGAGCC	TGCATGGAGAACTCGGGTGCCT	Ratón
γ-GCS	ACATCTACCACGCAGTCAAG	AAGAACATCGCCTCCATTCA	Ratón
NOX2	TTCGAAGACAACCTGGACAGG	GACTCTGGCATTACACACC	Ratón
NOX4	CCTCAACTGCAGCCTCATCC	CAACAATCTTCTTGTCTCTCC	Ratón
NRF1	GTCCCGACTCACTGCAGCTT	CAATATCCTGTCGCCAAAGGA	Ratón
PCG1α	CAACAATGAGCCTGCGAACA	TCTGTGAGAACCGCTAGCAAGTT	Ratón
PUMA	GCCCGTGAAGAGCAAATGAG	TGATGAAGGTGAGGCAGGCA	Humano
SNAIL	TCCAAACCCACTCGGATGTGAAGA	TTGGTGCTTGTGGAGCAAGGACAT	Ratón
SOD1	GCGATGAAAGCGGTGTGCGT	GTGGAACCATGCTGGCCTT	Ratón
SOD2	TGGGGCTGGCTTGGCTTCAA	GCGTGCTCCACACGTCAT	Ratón
SOD3	TAGCTGGGTGCTGGCTGAA	AGCAAGCCGTAGAACAAGAAGGC	Ratón
GUSB	ATCACCGTCACCACAGCGT	GTCCCATTCGCCACGACTTTGT	Ratón

Tabla 5. Cebadores utilizados en RT-PCR cuantitativa.

5. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNA

Para suprimir la expresión de los distintos genes diana se utilizaron siRNA (oligonucleótidos pequeños de interferencia de RNA) específicos. Los siRNA para p38 y p85 fueron prediseñados por Dharmacon (Lafayette, CO) y para Smad4 por Ambio (Warrington, UK). El procedimiento se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Para estos experimentos se sembraron las células a 60% de confluencia en medio completo. Al día siguiente se llevó a cabo el silenciamiento siguiendo las instrucciones de cada fabricante. Las células fueron transfectadas con SMARTpool siRNA de la subunidad reguladora p85 de PI3K (100 nM), de p38 α (200 nM), de Smad4 (20 nM) o con un siRNA no silenciante (a las mismas concentraciones) como control (NTC, *non-targeting* control). Para ello se preparó una mezcla de transfección para los distintos siRNAs compuesta por el siRNA correspondiente y el reactivo de transfección, en este caso oligofectamina (Invitrogen) que se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, esta mezcla se adicionó lentamente al plato de cultivo. Tras 6-8 horas de incubación a 37°C se cambió el medio a medio completo. Tras 24 horas, las células se tripsinizaron y se sembraron en las condiciones adecuadas para los posteriores experimentos.

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

Las células HepG2-BRA se sembraron en placas de 24 pocillos y después de los diferentes tratamientos se lavaron con PBS y se lisaron con 100 μ l de tampón de lisis reportero (Promega). Se midieron los niveles de actividad luciferasa en 40 μ l del lisado al que se le añadió 40 μ l del reactivo de ensayo de luciferasa (Promega). La cuantificación de la luminiscencia se realizó en un luminómetro Fluostar Omega (RMG Labtech). Los resultados se expresan como actividad luciferasa normalizada frente al número de células.

7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

7.1. Obtención de extractos proteicos

Las células se lavaron con PBS frío y posteriormente se despegaron de la placa de cultivo mediante rascado, manteniendo las placas en hielo. A continuación, se

centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm a 4°C. La lisis celular se realizó con tampón de lisis (5 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA) al que se le añadían extemporáneamente distintos inhibidores de proteasas (20 mM NaF, 1 mM NaVO₃, 1 mM PMSF, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml). Seguidamente, se mantenía en hielo durante 30 minutos agitando con vórtex cada 5 minutos para facilitar la lisis. Posteriormente, los lisados se centrifugaban 10 minutos a 13.000 rpm y se guardaban a -80°C.

Otro método utilizado fue la obtención directa de los extractos proteicos mediante rascado de las células en tampón de *Laemli* (2% SDS, 80 mM Tris-HCl, 10% glicerol, azul de bromofenol y β-mercaptoetanol) previo lavado con PBS frío. A continuación, las muestras se sometían a lisis mecánica mediante sonicación durante 30 segundos a una amplitud del 30%, seguido de desnaturalización a 100°C durante 10 minutos. En este caso no se realizaba una cuantificación de proteínas, se procedía, directamente, con la electroforesis de las proteínas.

7.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976). Para cada determinación se realizaba una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. Las muestras a valorar se preparaban por duplicado con 1 µl de extracto proteico, 49 µl de agua ultrapura y 200 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad) diluido 1:5. Tras 5 minutos a temperatura ambiente se cuantificó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Powerwave XS, Biotek).

7.3. Electroforesis de proteínas

Las proteínas presentes en los extractos celulares totales obtenidos previamente eran separadas en función de su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a distintas concentraciones (6-15%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las muestras proteicas se preparaban en tampón de carga Laemli (Tris 80 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, DTT 10 mM y azul de bromofenol 0,002% p/v) y se desnaturalizaban a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente se desarrollaba la electroforesis en un tampón de electroforesis (Tris 25 mM, SDS 0,1%, glicina 0,2 M pH 8,3) a voltaje constante (80-120 V), según el método descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989). En cada gel se cargaba un pocillo con un marcador de pesos moleculares (SeeBlue Plus2, Invitrogen), para facilitar la posterior identificación de la proteína de interés.

7.4. Transferencia de proteínas

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transferían a una membrana de PVDF o nitrocelulosa mediante el paso de corriente eléctrica, utilizando uno de los métodos siguientes:

- Para la transferencia de proteínas de masa molecular de hasta 90 KDa se utilizó un equipo de transferencia semi-seco usando como tampón de transferencia Tris-HCl 48 mM, SDS 0,04%, glicina 39 mM, metanol 20%, a pH 8,3; a 15 V.
- Para la transferencia de proteínas de masa molecular superior a 90 KDa se utilizó un equipo de transferencia en húmedo usando como tampón de transferencia Tris-HCl 66 mM, glicina 386 mM, SDS 0,1%, metanol 20%; a 100 V.

En ambos casos el tiempo de transferencia dependía de distintos parámetros relativos al gel como su grosor, tamaño y porcentaje de acrilamida. Tras la transferencia se realizaba una comprobación del proceso mediante la tinción de la membrana con Ponceau (0,5% en 1% ácido acético).

7.5. Inmunodetección de las proteínas

Tras la transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se incubaba en una solución de bloqueo TTBS (TrisHCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, a pH 7,5) suplementada con un 5% de leche desnatada en polvo o BSA, según las especificaciones de cada anticuerpo. Posteriormente, se incubaba a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido en TTBS suplementado con 0,5% de leche desnatada en polvo o 5% de BSA. A continuación, la membrana se lavó 10 minutos 3 veces con TTBS para así eliminar el anticuerpo no unido a la proteína y se incubó con el anticuerpo secundario apropiado, según el anticuerpo primario, diluido 1:5000 en TTBS al 0,5% de leche durante 1-2 horas en temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana era de nuevo lavada con TTBS y la inmunodetección se realizaba mediante una reacción de quimioluminiscencia con la enzima peroxidasa que lleva acoplada el anticuerpo secundario. Esta reacción se llevaba a cabo con un kit comercial (Pierce ECL Western blotting substrate).

Las membranas podían ser borradas para ser rehibridadas con otros anticuerpos, para ello se incubaban durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución de borrado (glicina 0,25 M en TrisHCl a pH 2) y se lavaban abundantemente en TTBS.

En la **tabla 6** se detallan los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas mediante western blot.

ANTICUERPO	PESO MOLECULAR	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	ESPECIE
β-actina	42 KDa	Sigma (#A5441) (clon AC-15)	1:5000	Ratón
p-Akt	60 KDa	Cell Signaling (#9271) (Ser473)	1:1000	Conejo
Bim	23 KDa	BD Biosciences (#559685)	1:1000	Conejo
Catalasa	60 KDa	Sigma C0979 (clon CAT-505)	1:2000	Ratón
Ciclina D1	37 KDa	Santa Cruz DSC-6 (#20044)	1:500	Ratón
γ-GCS	73 KDa	Abcam 40929	1:500	Conejo
Gapdh	37 KDa	Cell signalling (#2118) (14C10)	1:1000	Conejo
Id1	15 KDa	Santa Cruz c-20 (#sc-488)	1:500	Conejo
SOD2	24 KDa	Millipore (06-984)	1:1000	Conejo
Nox4	60 KDa	Cedido por la Dra. Fabregat	1:1000	Conejo
p27	27 KDa	Santa Cruz c-19 (#sc-528)	1:1000	Conejo
p-p38	43 KDa	Cell Signaling (#9211) (Thr180/Tyr1829)	1:1000	Conejo
p38	38 KDa	Santa Cruz SC-535	1:100	Conejo
p85	85 KDa	Millipore (#06-195)	1:5000	Conejo
Puma	23 KDa	Cell Signaling (#4976)	1:1000	Conejo
p-Smad1,5,8	52 KDa	Cell signaling (#9511); Smad1 (Ser463/465)/ Smad5 (Ser463/465)/ Smad8 (Ser426/428)	1:1000	Conejo
Smad1	58-60 KDa	Cell signaling (#9743)	1:1000	Conejo
p-Smad2	60 KDa	Cell signaling 3101 (Ser465/467) (#3101)	1:1000	Conejo
Smad2,3	58 KDa	BD Biosciences (#610842)	1:1000	Conejo
Smad4	70 KDa	Cell Signaling (#9515)	1:1000	Conejo

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en western blot.

8. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

8.1. Contaje de células

El contaje de células se llevó a cabo mediante un contador electrónico (Casy cell counter, Roche). Para ello se sembraron las células a baja densidad (20.000-40.000 células, según la línea) en placas de 12 pocillos. Pasado el tiempo de tratamiento o cultivo las células se despegaban mediante tripsinización y se contaban.

Alternativamente, el contaje celular se realizó mediante contaje en cámara de Neubauer previa tinción con un colorante vital, azul tripán.

8.2. Cristal violeta

Este método permite la cuantificación de las células que permanecen adheridas a la placa por ello es útil para cuantificar proliferación y muerte celular, en este último caso sólo cuando el proceso de toxicidad implica la pérdida de adhesión. Las células eran sembradas en placas de 12 pocillos y, tras los diversos tratamientos, eran lavadas con PBS e incubadas durante 30 minutos con la solución colorante y fijadora (cristal violeta 0,2% p/v en 2% etanol) a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminaba el exceso de colorante mediante lavado con agua destilada, se dejaba secar a temperatura ambiente y se añadía una solución de SDS al 1% para solubilizar las células y liberar el colorante. Finalmente, se realizaba la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 560 nm.

8.3. Incorporación de BrdU

La medida de incorporación de BrdU (Bromodeoxiuridina) se llevó a cabo mediante un ensayo ELISA con el kit colorimétrico de Roche. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000-10.000 células por pocillo. Se llevó a cabo una incubación de las células con BrdU durante 2 horas, tiempo en el que el BrdU se incorpora en lugar de los nucleótidos de timidina durante la síntesis del DNA. Después de retirar el medio de marcaje con BrdU, se realizaba la fijación de las células y la desnaturalización del DNA. Posteriormente, se añadía un anticuerpo acoplado a peroxidasa (POD) que se une al BrdU incorporado (anti-BrdU-POD). El complejo formado es detectado mediante una reacción enzimática colorimétrica basada en la adición del sustrato de la peroxidasa y producción de producto con color. Lectura de absorbancia a 370 nm en un lector ELISA.

8.4. Incorporación de timidina tritiada

La síntesis de DNA fue determinada mediante la incorporación de (^3H)-Timidina. Tras 6-8 horas de tratamiento con los factores, se añadió a los platos de cultivo una mezcla de timidina radiactiva (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidina, GE Healthcare) y timidina fría 1 μM (Sigma). Tras 24 horas de incubación con esta mezcla, se retiró el medio radiactivo y se lavaron las placas con PBS frío. A continuación, se cubrieron las células con una solución TCA (trichloroacetic acid) al 10% (p/v) durante 20 minutos a 4°C, para precipitar proteínas y ácidos nucleicos. Seguidamente se retiró el TCA y se lavaron las placas dos veces con etanol al 70% (v/v), dejándolas secar completamente. Por último, el material precipitado se recogió mediante incubación con una solución de composición 0,1 N NaOH, 2% Na_2CO_3 , SDS 0,5% (110 μl por pocillo, 20 minutos en agitación a temperatura ambiente). De este volumen se recogían 100 μl y se diluían en 2 ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer) y se leían en un contador de centelleo líquido (LKB wallac, modelo 1209 Rackbeta). Los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm) por pocillo.

8.5. Tinción nuclear con yoduro de propidio: núcleos mitóticos

250.000 células se sembraron en platos de 35 cm. Tras los diferentes tratamientos, se lavaron con PBS frío y se fijaron con una mezcla de metanol:acético (3:1) a -20°C durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con una solución de IP 5 $\mu\text{g/ml}$ (yoduro de propidio, Sigma, P-4170), 0,1% de Triton X-100, EDTA 0,1 M y 25 U/ml de RNAsa (Sigma) en PBS durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron de nuevo las células con PBS y sobre el fondo de la placa de cultivo se montó un cubreobjetos, utilizando Mowiol como medio de montaje. Los núcleos mitóticos se visualizaron y contaron en un microscopio de fluorescencia Eclipse TE300 (Nikon) con un objetivo 60X. De cada condición se contaron al menos 1.000 núcleos y se realizó un conteo ciego.

8.6. Análisis del contenido intracelular de DNA por citometría de flujo

Para estos ensayos se sembraron las células en platos de 60 cm. Tras someter a las células a los diferentes tratamientos, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 2.500 rpm, mientras que las células adheridas eran recogidas mediante tripsinización. El sedimento celular se lavó con PBS para eliminar posibles restos de medio o de tripsina. Seguidamente se procedió a fijar las células mediante la adición 300 μl de PBS y 700 μl etanol absoluto frío en agitación durante un minuto. Para eliminar el etanol se centrifugó 5 minutos a 2.500 rpm y 4°C.

Posteriormente el sedimento celular se lavó y se resuspendió en 0,5 ml de PBS. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C con 100 µg/ml de RNasa A (Boehringer Mannheim) se añadía IP a una concentración de 0,05 mg/ml en PBS y se incubaba a temperatura ambiente durante 15 minutos, en oscuridad. El análisis se realizó en el citómetro de flujo (FACScan, Beckton Dickinson) utilizando el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson) del Servicio de Citometría de la Universidad Complutense de Madrid. Los resultados se expresan como contenido de DNA en las distintas fases del ciclo celular.

9. CRECIMIENTO INDEPENDIENTE DE ANCLAJE: FORMACIÓN DE FOCOS EN AGAR

20.000 células fueron sembradas en placas multipocillo de 6 pocillos en medio 5% FBS y 0.45% de agarosa encima de una capa de agarosa solidificada (0.9% de agarosa en DMEM 5% FBS). Dos veces por semana se re-añadían 300 µl de medio con o sin tratamiento en función de cada condición. Las colonias de un tamaño superior a 50 µm fueron contadas tres semanas después de la siembra.

10. TINCIÓN DE β -GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA (SA- β gal)

El proceso de senescencia se evaluó mediante un ensayo cromogénico, tinción β gal asociada a senescencia siguiendo el protocolo de Debacq-Chainiaux (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009). Tras los tiempos de cultivo o tratamiento seleccionados, las células se lavaron con PBS y se fijaron con una solución fijadora (2% de formaldehído y 0,2% de glutaraldehído en PBS) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS y se incubó durante 16 horas a 37°C con solución de tinción (40 mM tampón ácido cítrico/fosfato sódico dibásico, 5 mM ferrocianina potásica, 5 mM ferricianina potásica, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ y 1 mg/ml X-Gal/DMSO). Finalmente, se lavó primero con PBS y después con metanol y se dejó secar a temperatura ambiente protegido de la luz. La tinción se observó en un microscopio de contraste de fases (Eclipse TE300, Nikon) conectado a una cámara (Nikon digital sight DS-U2).

11. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

11.1. Tinción nuclear con yoduro de propidio: núcleos apoptóticos

Estos ensayos se realizaron de igual forma a los de análisis de proliferación celular. Los núcleos apoptóticos se visualizaron y contaron en un microscopio de fluorescencia Eclipse TE300 (Nikon) con un objetivo 60X. De cada condición se realizó un conteo ciego de al menos 1.000 núcleos.

11.2. Análisis del contenido intracelular de DNA por citometría de flujo

Estos ensayos se realizaron de igual forma a los de análisis de proliferación celular. En este caso se analizó el porcentaje de células apoptóticas, aquellas con un contenido en DNA inferior a $2n$, es decir el pico correspondiente a las células con contenido hipodiploide de DNA.

11.3. Tinción con anexina V/IP y análisis mediante citometría de flujo

Estos experimentos se desarrollaron utilizando el kit comercial Anexina V-FITC/PI (BD Pharmingen). Una de las características de la apoptosis es la externalización de fosfatidilserina. Su detección se lleva a cabo mediante la unión de anexina V (marcada con FITC) a ella. El PI permite diferenciar las células apoptóticas tardías o necróticas (**Figura 19**).

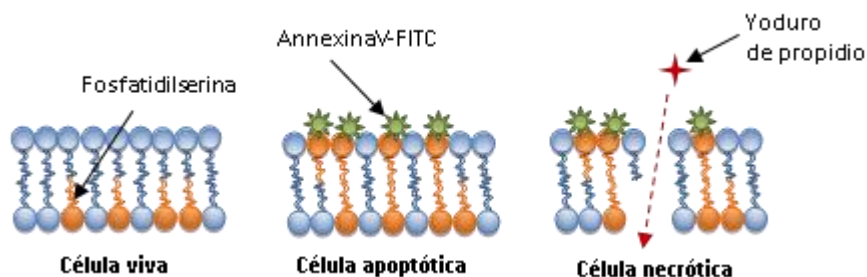


Figura 19. Detección con anexina V-FITC de la translocación de la fosfatidilserina en el proceso apoptótico.

Se sembraron 400.000 células en platos de 60 cm. Tras el tratamiento, las células se recogían mediante tripsinización y se centrifugaban a 1.300 rpm a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente se lavaba el sedimento celular con PBS frío y se resuspendía en tampón de unión del kit al que se añadió solución de Anexina V-FITC

y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se añadió IP a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se analizó en un citómetro FACScan (Beckton Dickinson) del Servicio de Citometría de la Universidad Complutense de Madrid. Los resultados se expresan como número de células apoptóticas, es decir, positivas para anexina y negativas para IP.

12. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (ROS)

Para la determinación de los ROS se utilizó DCFH₂-DA (2'-7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína, Molecular Probes). Este compuesto es incorporado en las células, donde se convierte en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂) por la acción de esterasas intracelulares. A su vez, el DCFH₂ al ser oxidado por el peróxido de hidrogeno se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), siendo este último compuesto fluorescente.

Para estos ensayos, fueron sembradas 725.000 células en platos de 60 cm. Después de los tratamientos, las células se despegaron de la placa de cultivo mediante tripsinización, se centrifugaron a 2.500 rpm durante 5 minutos, se lavaron dos veces con PBS atemperado y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 5 μM DCFH₂-DA.

Finalizado el tiempo de incubación con la sonda, se añadió IP a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que permitió la exclusión de las células muertas de la población celular. Se analizaron 15.000 células por condición mediante citometría de flujo en un citómetro FACScan (Beckton Dickinson) del Servicio de Citometría de la Universidad Complutense de Madrid.

13. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CARBONILADAS

La cuantificación de proteínas totales carboniladas se midió de acuerdo al método basado en su reacción con NDPH (2,4-dinitrofenilhidrazina). Esta es capaz de unirse covalentemente a los grupos carbonilo formando una base de Schiff para dar lugar a hidrazonas estables que absorben a 360 nm y pueden ser cuantificadas espectrofotométricamente constituyendo una medida de la cantidad de carbonilos presente (Levine *et al.*, 1990; Levine *et al.*, 1994).

La reacción se llevó a cabo en 150 µg de proteína a los cuales se añadió 4 volúmenes de NDPH 10 mM y se dejó incubando en oscuridad durante 1 hora, agitando cada 15 minutos para favorecer la interacción de los carbonilos y la NDPH. A continuación se añadió un volumen de TCA al 20% y se incubó en hielo durante 10 minutos. Después, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos para obtener el precipitado proteico, los cuales se lavaron 3 veces con una mezcla etanol: acetato de etilo (1:1). Posteriormente, se resuspendió el precipitado en 500 µl de guanidina 6 M. 200 µl de las proteínas solubilizadas se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 360 nm en un lector de placas (Powerwave XS, Biotek).

El valor de la absorbancia del contenido de carbonilos en las proteínas se corrigió con la medida de los blancos (proteína sin NDPH) que se realizaron en paralelo en cada muestra.

Finalmente, se aplicó la fórmula con el coeficiente de extinción 22.000 nmol L⁻¹cm⁻¹.

$$\text{nmol/mg proteína} = [(A \text{ muestra} - A \text{ blanco})/22.000]/ \text{mg proteínas}$$

14. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la acidificación del medio extracelular (ECAR) se realizó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA). Este instrumento es capaz de medir a tiempo real el consumo de oxígeno y la liberación de protones. Los niveles de analitos se miden hasta que la concentración de oxígeno desciende a 30 mmHg y el pH baja a 0,4 unidades de pH.

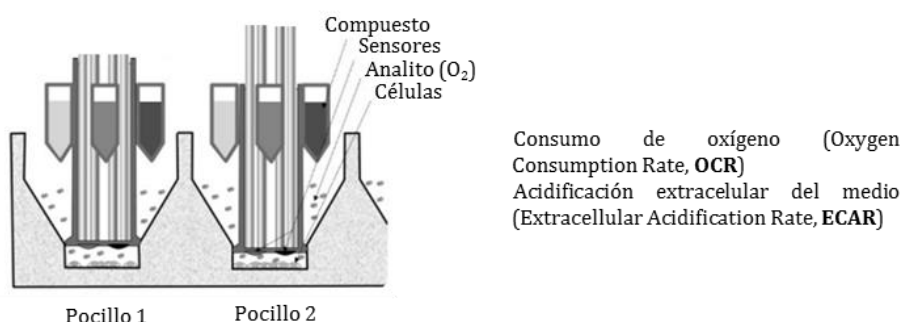
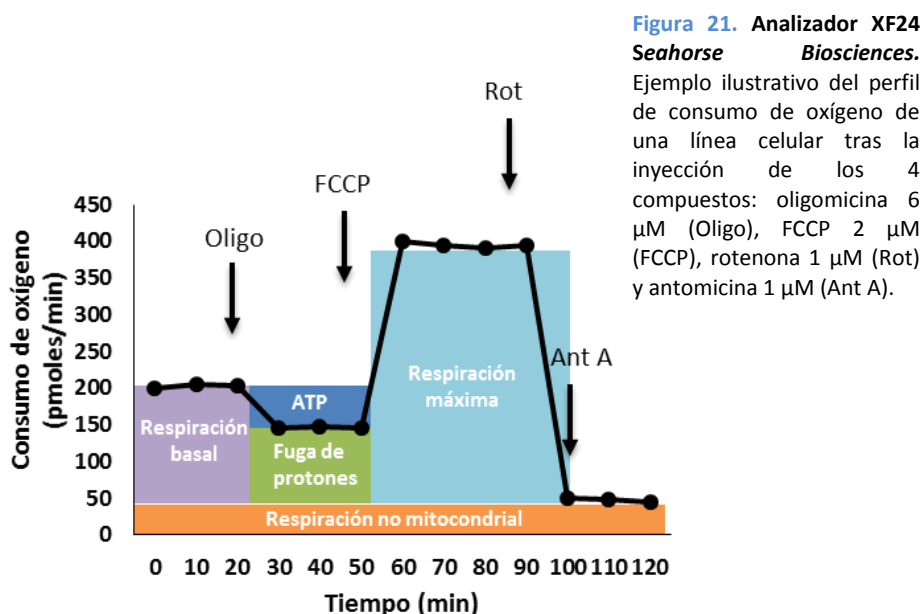


Figura 20. Analizador XF24 Seahorse Biosciences. Las placas calibradoras (Seahorse Biosciences) están provistas de dos biosensores que permiten la detección del O₂ y pH en células vivas; así como de 4 puertos para la inyección de compuestos distintos de forma consecutiva en los pocillos.

Las células se sembraron a una densidad de 30.000 células por pocillo en 200 μ l de medio DMEM en placas de 24 pocillos especiales que contienen dos biosensores fluorescentes (O_2 y pH) (Figura 20). Durante 15 horas se cultivaron a 37°C y 5% CO_2 para favorecer el asentamiento del cultivo. Transcurrido este tiempo se substituyó por medio de cultivo sin tamponar y se dejaron las células durante al menos una hora para que, tanto temperatura como pH se equilibrasen.



Antes de las medidas se lleva a cabo la calibración de los biosensores del aparato con una solución de referencia con valores de oxígeno y pH conocido. El aparato consta de 4 puertos diferentes que van a inyectar de forma secuencial compuestos:

- Inhibidor de las síntesis de ATP (6 μ M oligomicina).
- Desacoplante de la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria (2 μ M FCCP).
- Inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria (1 μ M Rotenona y 1 μ M Antimicina).

Los datos de consumo de oxígeno de cada pocillo se corrigen por cantidad de proteína y se expresan como pmoles de oxígeno consumido por minuto. La acidificación extracelular se expresa en unidades de mili-pH por minuto.

A partir de estos datos podemos obtener distintos valores: capacidad respiratoria máxima, estimulación de la respiración, nivel máximo de glicolisis y estimulación de la glicolisis ([Figura 21](#)).

15. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE LACTATO

La producción de lactato fue determinada en el medio de cultivo de las células. El método se fundamenta en la conversión de L-lactato a piruvato por la enzima LDH (lactato deshidrogenasa) en presencia de NAD^+ con la consiguiente formación de NADH, cuya concentración se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm.

Para estos ensayos, 130.000 células fueron sembradas en placas de 12 pocillos. Tras 15 horas se llevó a cabo una privación de suero durante 2 horas tras las cuales, se recogió el medio de cultivo para su posterior utilización y se realizó el conteo del número de células.

A continuación se llevó a cabo la reacción enzimática en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadió 16 μl de NAD^+ (17 mg/ml), 217 μl de tampón (glicina 0,5 M, hidracina 0,4 M y 17 mg/ml NAD^+) y 16 μl de muestra (medio de cultivo) y se realizó una lectura inicial a 340 nm en el espectrofotómetro. A continuación se añadió 1 μl de LDH (2,5 KU), se incubó a 25°C y se midió a la misma longitud de onda transcurrida una hora. En paralelo se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de lactato a partir de la cual se calculó la de las muestras. Se calculó la concentración de lactato por hora y se corrigió en función del número de células.

16. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE MITOCONDRIAS

La cuantificación del número de mitocondrias se realizó gracias al marcaje de este orgánulo con una sonda específica, Mitotracker Green (Molecular Probes).

Para ello, las células se cultivaron en cubres circulares de vidrio dentro de placas de 24 pocillos cubiertos previamente con gelatina al 2% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron con Mitotracker Green (500 nM) a 37°C durante 30 minutos. Tras este tiempo se lavaron 2 veces con PBS y, a continuación, se visualizaron en un microscopio láser confocal Leica (DMIRE-2) del Centro de Citometría y Microscopía de fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

La cuantificación numérica se realizó mediante un *plug in* específico del programa Image J.

17. ENSAYOS DE INVASIÓN

La capacidad migratoria/invasiva *in vitro* de las células se analizó utilizando cámaras *transwell* (BD), con filtro poroso de policarbonato de 8 μm de diámetro, previamente cubierto con matrigel (400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Figura 22). Las células se mantuvieron en DMEM sin suero durante 2 horas, se tripsinizaron y se sembraron en la cámara superior del *transwell* (50.000 células/ cm^2) en DMEM sin suero con 0,1% BSA, donde además se añaden los tratamientos correspondientes. En el compartimento inferior se añadió DMEM sin suero.

Tras 24 horas de incubación las células que habían atravesado a la cara inferior del filtro se fijaron y tiñeron con cristal violeta (0,2% p/v en 2% etanol) durante 30 minutos. La cuantificación se realizó mediante conteo en microscopio invertido de contraste de fases de un número representativo de campos del filtro (20 campos usando un objetivo 20X).

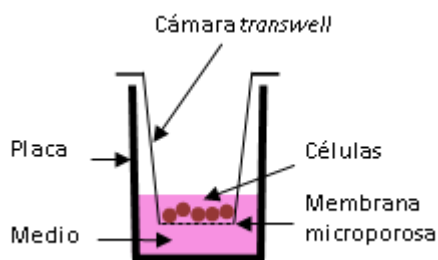


Figura 22. Esquema de la cámara de cultivo celular *Transwell*.

18. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Las representaciones graficas de los resultados se han elaborado utilizando el valor medio \pm error estándar de la media (S.E.M.). La significatividad estadística se ha determinado mediante el test “t de Student” y se indica en las gráficas de la siguiente manera: ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$ y n.s.: no significativo.

5. RESULTADOS

1.

PAPEL DE BMP9 EN LA PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES HEPÁTICAS Y EN CÉLULAS HEPÁTICAS EN DISTINTOS ESTADIOS DE DESARROLLO

Estudios previos señalaban que BMP9 se expresa en el hígado en las etapas fetal (Celeste *et al.*, 1994) y adulta (Miller *et al.*, 2000; Bidart *et al.*, 2012), donde se une a receptores de membrana en células no parenquimáticas, en particular células endoteliales y células de Kupffer (Miller *et al.*, 2000), pero de su función en el hepatocito se sabe muy poco. Se había descrito que BMP9 se une a receptores de membrana en células HepG2, una línea celular de tumor hepático, en las que producía un aumento de la proliferación a concentraciones elevadas del factor (1000 ng/ml) (Song *et al.*, 1995).

1.1. BMP9 promueve crecimiento celular en células tumorales hepáticas pero no en hepatocitos no transformados

Basándonos en estas observaciones estudiamos el papel de BMP9 en la proliferación de las células HepG2. En primer lugar, se realizó un estudio dosis-respuesta incubando estas células con diferentes concentraciones de BMP9 durante 4 días. Las células se mantuvieron durante 15 horas en un medio bajo en suero (0,1% FBS) para evitar el efecto de concentraciones bioactivas de BMPs que se encuentran en el suero (David *et al.*, 2008; Herrera and Inman, 2009) y que pueden interferir con nuestros resultados. Posteriormente, se trataron con BMP9 (**Figura 23A**). Comprobamos como BMP9 induce un aumento del número de células de forma dosis dependiente, alcanzando un máximo a 5 ng/ml, concentración que utilizamos en los siguientes experimentos. Además, estudiamos el efecto de BMP9 en el crecimiento celular a distintos tiempos realizando una curva de proliferación (**Figura 23B**). A partir de dos días de tratamiento ya se observan diferencias significativas en el número de células entre las células tratadas y no tratadas con BMP9, de hecho, estas diferencias aumentan con el tiempo. La magnitud del efecto de BMP9 en el número de células es fácilmente observable por microscopía, donde se aprecia un aumento en el tamaño de las colonias con respecto a la condición control (**Figura 23C**).

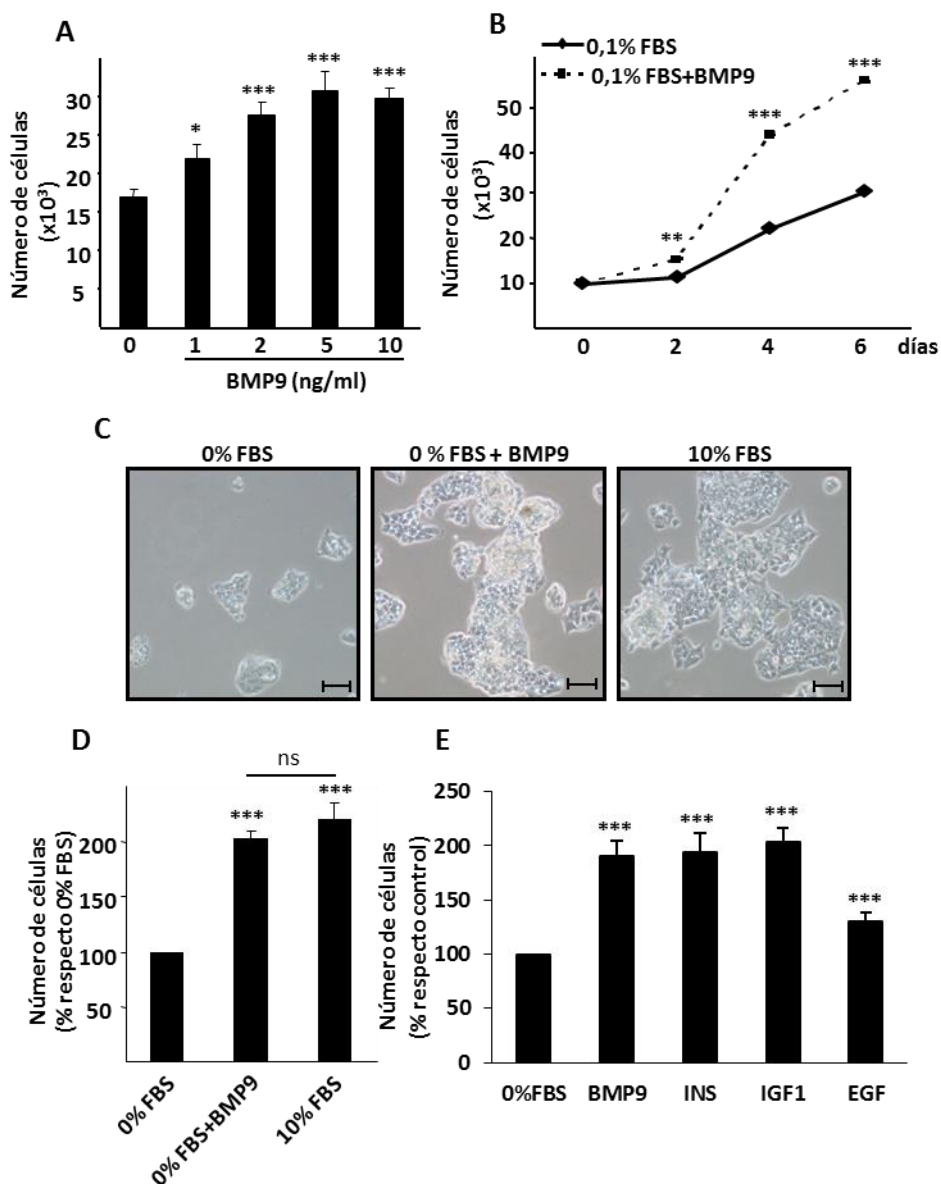


Figura 23. Efecto de BMP9 en el número de células HepG2. **A.** Contaje del número de células tras incubación 4 días con diferentes concentraciones de BMP9 en medio 0,1% FBS. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **B.** Contaje del número de células HepG2 tras tratamiento con BMP9 (5 ng/ml) en medio 0,1% FBS durante 2, 4 y 6 días. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **C.** Imágenes tomadas en microscopio de contraste de fases tras incubación de las células en medio 10% y 0% FBS +/- BMP9 (5 ng/ml) durante 3 días. La barra de escala representa 50 μ m. **D.** Análisis de la viabilidad celular mediante tinción con cristal violeta de las células HepG2 incubadas durante 4 días +/- BMP9 (5 ng/ml) en medio 0,1% FBS o en medio 10% FBS. Datos de 2 experimentos independientes con $n = 6$ (media \pm S.E.M.). **E.** Contaje tras 4 días de tratamiento con BMP9 (5 ng/ml), insulina (INS, 100 nM), IGF1 (10 nM) o EGF (40 ng/ml) en medio 0% FBS o en medio 10% FBS. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

Además, la densidad que se alcanza recuerda a la que se observa en las células que crecen en medio completo con suero. Para analizar este hecho, cuantificamos el crecimiento celular y corroboramos que el tratamiento de las células con BMP9 en ausencia de suero produce un crecimiento similar al de las células cultivadas en presencia de suero (**Figura 23D**).

Para estudiar la relevancia del efecto proliferativo de BMP9 en estas células, lo comparamos con el de otros mitógenos hepáticos ya conocidos como EGF, insulina e IGF1. Los datos obtenidos indicaron que la inducción de proliferación promovida por BMP9 era comparable con la obtenida por estos mitógenos a sus concentraciones óptimas (**Figura 23E**).

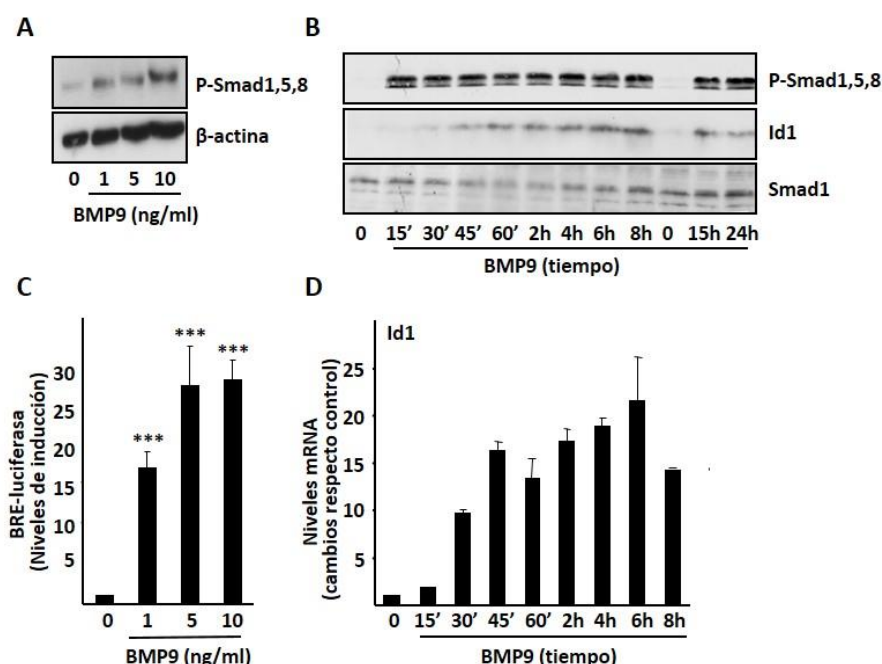


Figura 24. BMP9 activa la vía de Smad1,5,8 en células HepG2. **A.** Se realizó un *western blot* con extractos proteicos recogidos tras 1 hora de tratamiento de las células con distintas concentraciones de BMP9 en medio 0,1% FBS. **B.** Se realizó un *western blot* con los extractos proteicos recogidos tras tratamiento de las células con 5 ng/ml de BMP9 durante distintos periodos de tiempo. Se muestra un experimento representativo de $n = 3$. Smad1 como control de carga. **C.** Las células HepG2-BRA fueron tratadas con distintas concentraciones de BMP9 durante 15 horas. Actividad luciferasa corregida en función del número de células. Datos de un experimento representativo ($n = 4$) de 3 realizados (media \pm S.D.). **D.** Las células HepG2 fueron incubadas \pm BMP9 (5 ng/ml) en medio 0,1% FBS durante distintos periodos de tiempo. Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de Id1 normalizados con la expresión de 18S. Análisis de los cambios relativos sobre las células sin tratar (media \pm S.E.M., $n = 3$). *** = $P < 0,001$.

La vía de Smad1,5,8 es la vía clásica activada por la familia de las BMPs al unirse a sus receptores de membrana. Quisimos estudiar si BMP9 podría activar esta ruta en las células de HCC. Realizamos un estudio dosis respuesta y

RESULTADOS

observamos mediante *western blot* que BMP9 induce la fosforilación de Smad1,5,8, a partir de concentraciones muy bajas (1 ng/ml) alcanzando un efecto máximo a 5 ng/ml (**Figura 24A**). Utilizamos esta concentración para analizar la respuesta en el tiempo (**Figura 24B**) y vemos que esta fosforilación ocurre tempranamente (a los 15 minutos) y se mantiene así hasta las 24 horas.

Para analizar el efecto de BMP9 sobre la transcripción, se utilizaron las células HepG2BRA, células que expresan establemente una construcción con un elemento de respuesta a BMP (BRE) del promotor del inhibidor de diferenciación 1 (Id1), fusionado a un gen reportero con actividad luciferasa. Así, el tratamiento con BMP9 produjo un aumento de la actividad luciferasa alcanzando un máximo a la concentración de 5 ng/ml (**Figura 24C**). Además, estudiamos la posible regulación de Id1 ya que es uno de los genes diana clásicos de las BMP, un factor de transcripción encargado de regular importantes funciones de las BMPs. Comprobamos que BMP9 aumenta la expresión de este gen a nivel de proteína (**Figura 24B**) y a nivel de mRNA (**Figura 24D**).

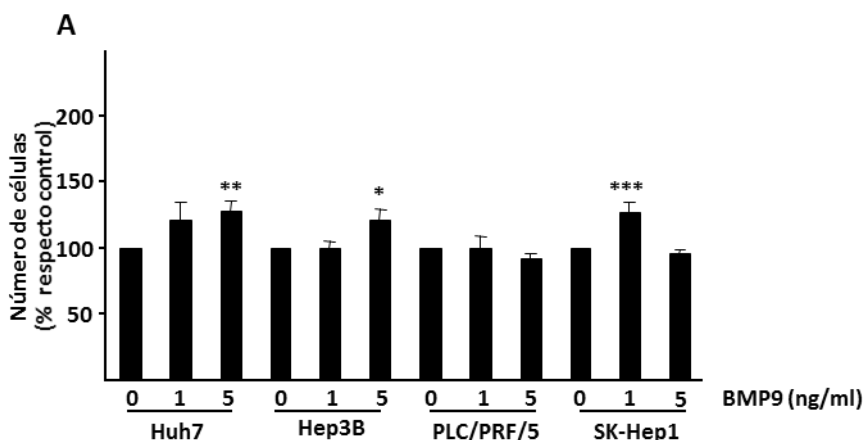


Figura 25. Efecto de BMP9 en el número de células en líneas celulares de cáncer hepático. A. Las líneas celulares Huh7, Hep3B, PLC/PRF/5 y SK-Hep1 fueron incubadas en ausencia o presencia de BMP9 a 1 y 5 ng/ml en medio 0,1% FBS y contadas tras 4 días. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

Dado que el BMP9 ejercía un importante efecto proliferativo en las células HepG2, nos preguntamos si este efecto se observaría también en otras líneas celulares de cáncer hepático como las líneas Huh7, Hep3B, PLC/PRF/5 y SK-Hep1. Mientras que en las células PLC/PRF/5 no se observó efecto proliferativo de BMP9, en las células Huh7, Hep3B y SK-Hep1 se observa un aumento significativo del número de células en alguna de las concentraciones de BMP9 ensayadas (**Figura 25**).

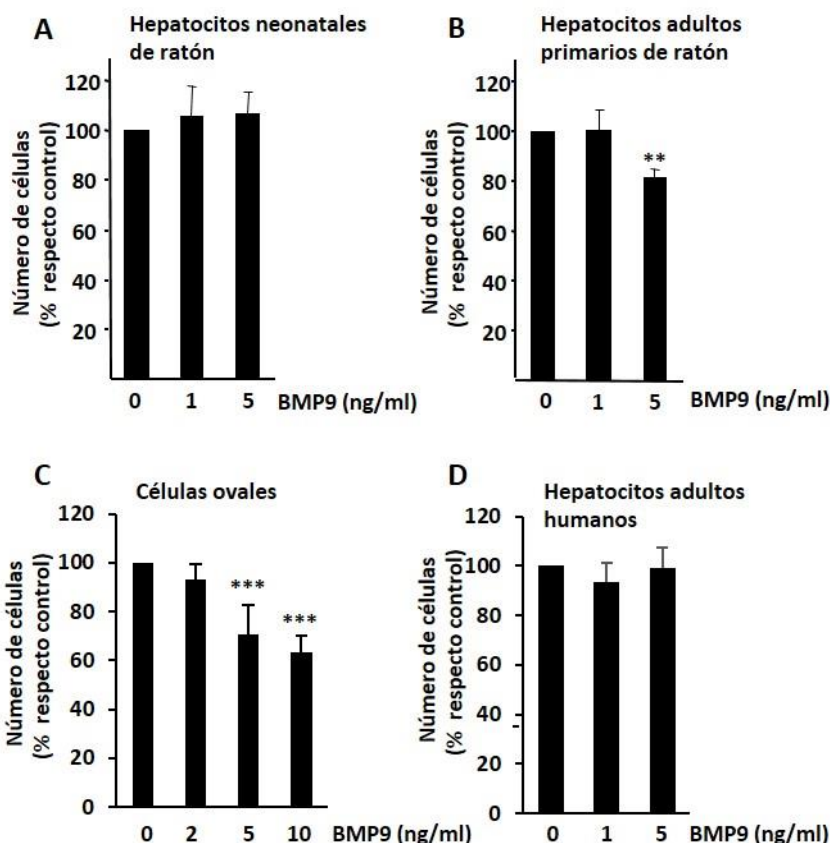


Figura 26. Efecto de BMP9 en el número de células en líneas hepáticas no transformadas. A-D. Los hepatocitos neonatales de ratón (A), hepatocitos adultos primarios de ratón (B), células ovas de ratón (C) y hepatocitos adultos humanos (D) fueron incubadas +/- BMP9 (1 o 5 ng/ml) en medio 0,1% FBS y contadas a los 2 (A y B) o 4 días (C y D). Datos de 2 (A y B), 4 (C) y 3 (D) experimentos independientes realizados por triplicado (A, B y D) o cuadruplicado (C) (media \pm S.E.M.). *** = $P < 0,001$.

A continuación analizamos el efecto de BMP9 en distintas líneas celulares hepáticas no transformadas en distintos estadios de desarrollo disponibles en nuestro laboratorio, tales como hepatocitos neonatales inmortalizados de ratón, hepatocitos adultos primarios de ratón, células progenitoras de hígado adulto de ratón (células ovas) y hepatocitos adultos inmortalizados de humano (THLE3). En las células de origen murino, el tratamiento con BMP9 no alteró el número de hepatocitos neonatales (Figura 26A), mientras que en los hepatocitos adultos se aprecia una pequeña disminución (Figura 26B). La población de células ovas (Figura 26C) disminuye de forma significativa con el tratamiento con BMP9. El número de células de la línea de hepatocitos humanos THLE3 (Figura 26D) no ve alterado con el tratamiento de BMP9. Sin embargo, para confirmar estos datos de una forma más sólida, analizamos el número de células THLE3 en presencia o en ausencia de suero, a distintas concentraciones de BMP9 (Figura 27A) y distintos

RESULTADOS

tiempos (Figura 27B) y en ninguna de estas condiciones observamos variaciones en el número de células, por lo que concluimos que BMP9 no altera al número de hepatocitos humanos no transformados.

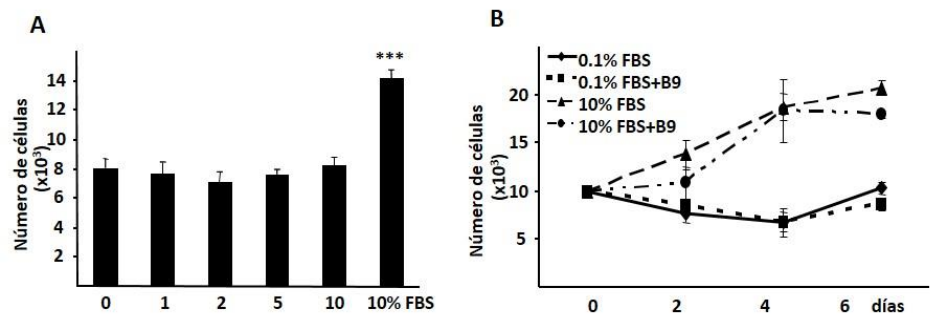


Figura 27. Efecto de BMP9 en el número de células THLE3. A. Las células THLE3 fueron incubadas en medio 0,1% FBS con distintas concentraciones de BMP9 o en medio 10% FBS sin tratamiento y contadas después de 4 días de tratamiento. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). B. Curva de proliferación de las células THLE3 incubadas diferentes períodos de tiempo en ausencia o presencia de BMP9 (5 ng/ml) en medio 0,1% o 10% FBS. Datos de un experimento representativo de 3 realizados de forma independiente por triplicado (media \pm S.E.M.). *** = $P < 0,001$.

Quisimos comprobar que la ausencia de efecto en las células no transformadas no se debía a una falta de respuesta de las células a BMP9 y para ello estudiamos esta vía de señalización en las distintas líneas. Observamos que todas las líneas estudiadas son capaces de responder a BMP9 en las condiciones ensayadas activando la vía canónica (Figura 28).



Figura 28. Señalización disparada por BMP9 en líneas hepáticas no transformadas. A–C. Extractos proteicos de hepatocitos neonatales de ratón (A), hepatocitos adultos de ratón (B) y células ovales (C) incubados con \pm BMP9 (1, 5 y 10 ng/ml) en medio 0,1% FBS durante 1 hora se utilizaron para realizar *western blot*. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados. Se usó Smad1 o GAPDH como control de carga.

Todos estos datos sugieren que BMP9 promueve crecimiento celular en líneas de tumor hepático, efecto que no se observa en hepatocitos no transformados.

1.2. La producción autocrina de BMP9 mantiene el crecimiento dependiente e independiente de anclaje en células HepG2

Durante el estudio del efecto de BMP9 en la inducción de la proliferación en las células HepG2, observamos que estas células eran capaces de proliferar a bajas concentraciones de suero (0,1% FBS) (**Figura 23B**). Estos datos, asociados al hecho de que los hepatocitos humanos tanto los transformados como los no transformados expresan BMP9, nos llevaron a pensar en la posibilidad de la existencia de un efecto autocrino de BMP9 en las células HepG2.

Para estudiar esta hipótesis utilizamos dorsomorfina (Dm) y LDN193189, dos inhibidores de la señalización de las BMPs que actúan a nivel de los receptores de tipo I (ALK2, 3 y 6). Dm fue descubierta recientemente en un *screening* en embriones de peces cebra (Yu *et al.*, 2008b) y posteriormente, tomando Dm como patrón se desarrolló LDN193189, el cual tiene una acción más específica y potente que Dm (Yu *et al.*, 2008a). En primer lugar comprobamos la eficacia de ambos inhibidores, ensayando su capacidad de inhibir la fosforilación de Smad1,5,8 inducida por BMP9. Tanto Dm (1 μ M) como LDN193189 (100nM) bloquean de hecho este efecto (**Figura 29A, 29B**). Además, en estas condiciones, ambos inhibidores impiden el aumento de la proliferación inducido por el tratamiento con BMP9 en las células HepG2 (**Figuras 29C, 29D**).

Cuando las células HepG2 son incubadas en bajas concentraciones de suero (0,1% FBS), en ausencia de BMP9 y en presencia de los inhibidores (Dm o LDN193189) encontramos una disminución en la proliferación basal de estas células (**Figura 29E**). Estos datos sugieren la existencia de una producción autocrina de BMPs que contribuye al crecimiento de estas células.

Se ha descrito que diferentes BMPs regulan o contribuyen al crecimiento independiente de anclaje en células tumorales, incluidas las líneas de HCC (Maegdefrau and Bosserhoff, 2012). Por ello, quisimos analizar la implicación de BMP9 en este proceso estudiando la formación de colonias en agar de las células HepG2 y observamos que el tratamiento con BMP9 promueve un aumento en el número de colonias en estas células comparadas con las condiciones control -sin tratamiento-. El tratamiento con Dm también induce una disminución frente al número de colonias que se obtiene sin tratamiento, hecho que de nuevo apunta a que la producción autocrina de BMPs puede contribuir en este fenómeno (**Figura 7F**).

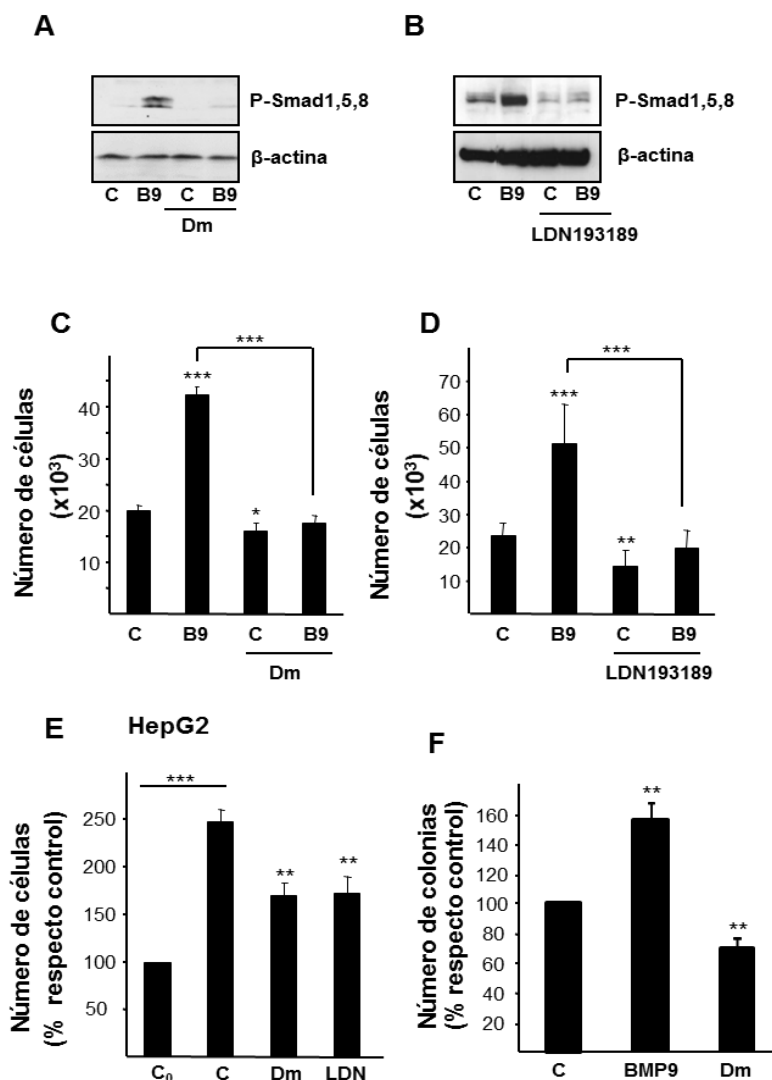


Figura 29. Efecto de la inhibición del receptor de BMPs en el crecimiento de las células HepG2. **A. B.** Las células HepG2 fueron incubadas durante 1 hora con **(A)** dorsomorfina (Dm, 1 μ M) o **(B)** LDN193189 (100 nM) y +/- BMP9 (5 ng/ml). Posteriormente se realizó *western blot* con los extractos proteicos. β -actina como control de carga. **C.D.** Las células fueron tratadas como en A y B, respectivamente, y se contaron a los 4 días. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **E.** Las células HepG2 fueron incubadas con dorsomorfina (Dm, 1 μ M) o LDN193189 (100 nM) en medio 0,1% FBS y contadas a los 4 días. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Análisis de datos frente al número de células contadas antes de empezar el tratamiento (C₀) (media \pm S.E.M.). **F.** Las HepG2 fueron sembradas en *soft agar* y tratadas con BMP9 (5 ng/ml) o dorsomorfina (Dm, 1 μ M) durante 3 semanas (renovando el tratamiento 2 veces por semana). Contaje del número de colonias. Datos de 4 (BMP9) y 8 (Dm) experimentos. * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

Además, utilizamos una molécula más específica, capaz de actuar como un atrapador de ligando (*ligand trap*) de BMP9 consistente en el dominio extracelular de ALK1 (ALK1ecd) purificado, el cual se une a BMP9 (y BMP10) con alta afinidad impidiendo su unión a los receptores de la membrana celular. Como observamos

con Dm o LDN193189, ALK1ecd también impide la activación de Smad1,5,8 inducida por BMP9 (**Figura 30A**) y bloquea su efecto proliferativo (**Figura 30B**).

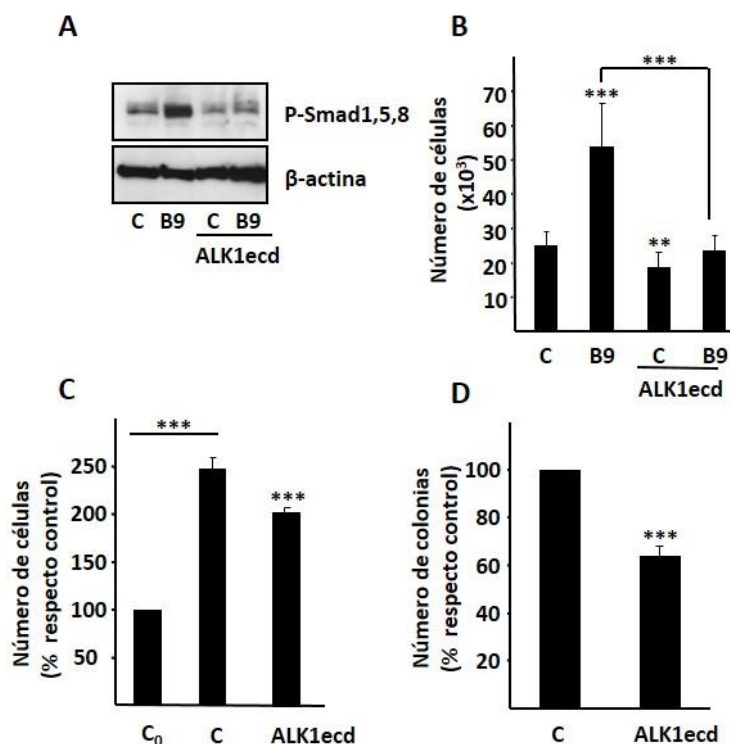


Figura 30. Efecto de ALK1ecd en el crecimiento de las células HepG2. **A.B.** Las células HepG2 fueron incubadas en medio 0,1% FBS con ALK1ecd (16 F.M.E.) y +/- BMP9 (5 ng/ml). **A.** Después de 1 hora de tratamiento se recogieron los extractos proteicos para realizar un *western blot*. β-actina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados. **B.** Tras 4 días de tratamiento se realizó un conteo de células. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media ± S.E.M.). **C.** Las células HepG2 fueron incubadas +/- ALK1ecd (16 F.M.E.) en medio 0,1% FBS y contadas a los 4 días. Datos de 3 experimentos realizados por triplicado. Análisis como porcentaje frente al número de células contadas antes de tratar (C₀, día 0) (media ± S.E.M.). **D.** Las células HepG2 fueron sembradas en *soft agar* y tratadas con ALK1ecd (16 F.M.E.) durante 3 semanas (añadiendo el tratamiento 2 veces en semana). Contaje del número de colonias. Datos de 4 experimentos realizados por triplicado (media ± S.E.M.). ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

La disminución de la proliferación basal en presencia de ALK1ecd en ausencia de suero (**Figura 30C**) corrobora los datos obtenidos con los inhibidores, y debido a su especificidad, pone de manifiesto el papel concreto de BMP9 en estos efectos. Además, el tratamiento con este atrapador disminuye la capacidad de formar colonias de estas células respecto a las células que crecen en condiciones control. (**Figura 30D**). Conjuntamente, estos resultados indican que las células HepG2 presentan una producción autocrina de BMPs, en particular de BMP9, que contribuye al crecimiento basal de estas células.

RESULTADOS

Por otra parte, el crecimiento de las células THLE3 no se ve alterado en presencia de ALK1ecd, hecho que de nuevo indicaría que los hepatocitos humanos no transformados no presentarían una producción autocrina de BMP9 que sustente su proliferación (**Figura 31A**). De forma interesante, también observamos que el tratamiento con ALK1ecd de las células Huh7, Hep3B y HepG2 en presencia de suero (10% FBS) produce una disminución en el ritmo de crecimiento de estas células, sugiriendo que el BMP9 presente en el suero del medio actúa como un factor proliferativo para ellas (**Figura 31B**).

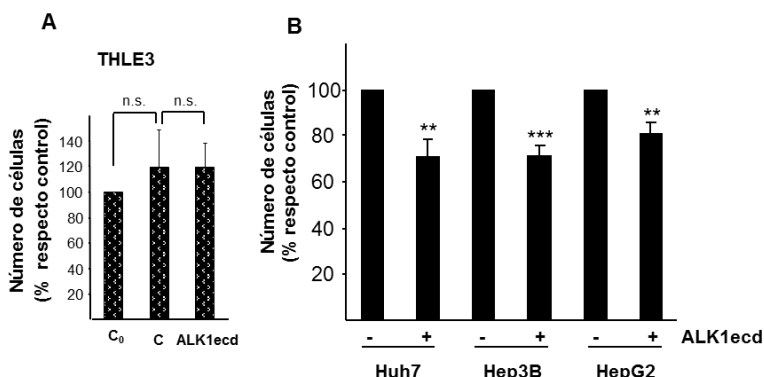


Figura 31. Efecto de la inhibición de la señalización de BMP9 en el crecimiento de THLE3 y líneas tumorales hepáticas. **A.** Las células THLE3 fueron incubadas fueron incubadas +/- ALK1ecd (16 F.M.E.) en medio 0,1% de suero y contadas a los 4 días. Datos de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **B.** Las células Huh7, Hep3B, HepG2 y THL3 fueron incubadas +/- ALK1ecd en medio 10% FBS y contadas a los 4 días. Datos de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.)* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$ o n.s. = no significativo.

Para confirmar que la producción autocrina de BMP9 contribuye al crecimiento basal de las células HepG2 llevamos a cabo un silenciamiento transitorio de BMP9 en estas células utilizando dos oligonucleótidos con secuencias diferentes. Tras comprobar que en nuestras condiciones experimentales se producía una disminución en la expresión de BMP9 de un 40-50% (**Figura 32A**) analizamos el crecimiento de las células en estas condiciones. A nivel basal se observa que las células que expresan niveles reducidos de BMP9 presentan una disminución del 30% en el crecimiento celular respecto a las células con niveles normales de BMP9 (**Figura 32B**). Sin embargo, la respuesta al tratamiento con BMP9 exógeno no se ve alterada cuando se reducen los niveles de expresión de BMP9 de las células HepG2 (**Figura 32A**).

Las células HepG2 poseen una producción autocrina de BMP9 que sustenta su crecimiento basal.

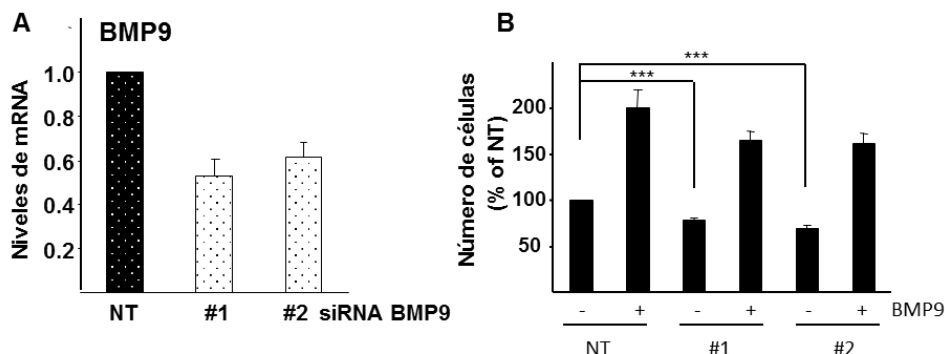


Figura 32. Efecto del silenciamiento de BMP9 en el crecimiento de las células HepG2. Las células HepG2 fueron transfectadas de forma transitoria con siRNA no silenciante control (siRNA NT) o con dos siRNA de BMP9 diferentes (siRNA BMP9 #1 y #2). **A.** Análisis del silenciamiento tras 48 horas mediante RT-PCR cuantitativa de la expresión génica de BMP9 normalizando frente a los niveles de 18S. **B.** Las células fueron incubadas con BMP9 (5 ng/ml) en medio 0,1% FBS y contadas tras 6 días. Se muestran datos de un experimento representativo de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.D.). *** = $P < 0,001$.

1.3. BMP9 aumenta la proliferación e impide la apoptosis mediada por ausencia de suero en células HepG2

Ya que nuestros resultados indican que BMP9 promueve un aumento del número de células HepG2, quisimos determinar cuáles son los mecanismos moleculares que subyacen detrás de este efecto. Las BMPs han sido descritas como factores promotores de proliferación y supervivencia en diferentes tipos celulares (Barneda-Zahonero *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2012).

En un primer abordaje, estudiamos un posible efecto de BMP9 en la síntesis de DNA mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada y comprobamos que, en efecto, BMP9 promueve la proliferación de las células HepG2 (**Figura 33A**). Estos datos se corroboraron mediante el estudio del contenido de DNA mediante citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio (**Figura 33B**). Nuestros resultados muestran un mayor porcentaje en las fases S-G2-M en células tratadas con BMP9 que en células sin tratar, pasando de un 37,90 a un 45,41%, valores muy cercanos a los obtenidos en 10% FBS (49,11%).

Además, BMP9 es capaz de modular la expresión de reguladores del ciclo celular (**Figura 33C**) induciendo un aumento en la expresión de ciclina D1 y una disminución de la de p27 (proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas). Esta modulación está implicada en la progresión desde G1 hacia la fase S del ciclo celular.

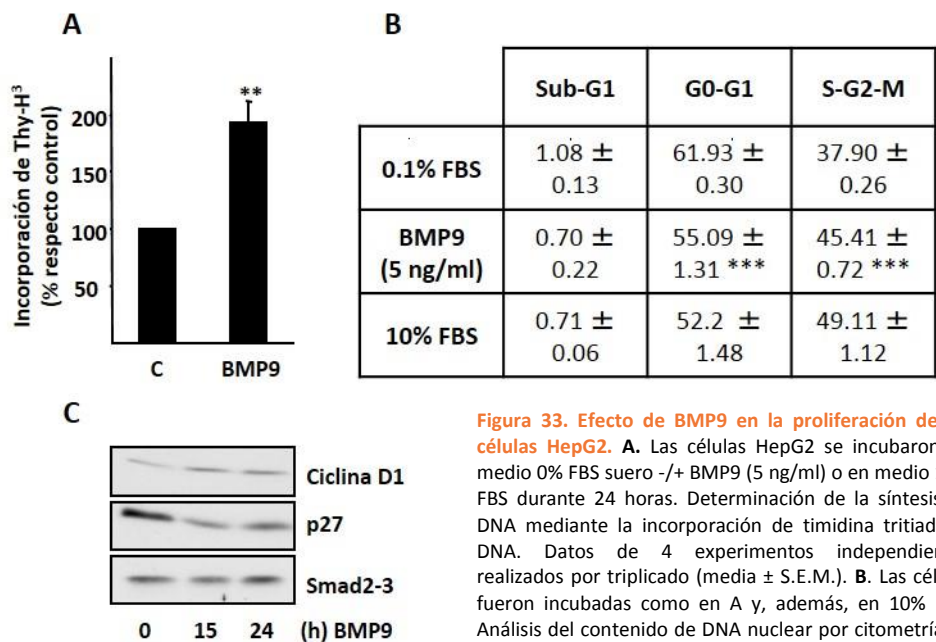


Figura 33. Efecto de BMP9 en la proliferación de las células HepG2. **A.** Las células HepG2 se incubaron en medio 0% FBS suero +/- BMP9 (5 ng/ml) o en medio 10% FBS durante 24 horas. Determinación de la síntesis de DNA mediante la incorporación de timidina tritiada al DNA. Datos de 4 experimentos independientes realizados por triplicado (media ± S.E.M.). **B.** Las células fueron incubadas como en A y, además, en 10% FBS. Análisis del contenido de DNA nuclear por citometría de flujo. Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media ± S.E.M.). **C.** Las células HepG2 fueron incubadas en medio 0% FBS +/- BMP9 (5 ng/ml) durante 15 y 24 horas para la obtención de extractos proteicos. Análisis mediante *western blot* de reguladores de ciclo. Smad2-3 como control de carga. ** = P < 0,01; *** = P < 0,001.

La inducción de apoptosis mediada por ausencia de suero en las células HepG2 se ha descrito con anterioridad (Kang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008) y, de hecho, este efecto se observa también en nuestras condiciones de ensayo (0,1% FBS) tras 4 días. Al analizar el contenido de DNA por citometría de flujo tras 24 horas en 0,1% FBS, en tratamiento con BMP9 o en presencia de suero, no se observaron diferencias en el número de células con un contenido en DNA inferior a 2n, esto es, células hipodiploides que reflejan un proceso de apoptosis. Así, en todas las condiciones ensayadas se vio que el porcentaje de células hipodiploides era muy bajo, alrededor del 1% (Figura 33B).

Sin embargo, en estudios realizados tras 4 días de tratamiento, se observan grandes diferencias en el porcentaje de células hipodiploides (Figura 34A). Las células incubadas en 0,1% FBS presentan un gran pico de células hipodiploides, es decir, aproximadamente un 40% de la población celular está sufriendo un proceso apoptótico. El tratamiento con BMP9 reduce este porcentaje por debajo del 20% siendo un valor más cercano a los obtenidos en presencia de suero. Para corroborar estos datos, se realizaron ensayos de citometría de flujo para analizar la exposición

de fosfatidilserina al exterior de la membrana plasmática tras tinción con anexina y yoduro de propidio. Comprobamos que el número de células apoptóticas (anexina positivas/yoduro de propidio negativas), es mucho más elevado en ausencia de suero que en las células tratadas con BMP9 (Figura 34B). Por último, se realizó una cuantificación de núcleos apoptóticos y los resultados que se muestran en la Figura 34C ponen de manifiesto de nuevo que BMP9 es capaz de rescatar del proceso apoptótico inducido por baja concentración de suero en células HepG2.

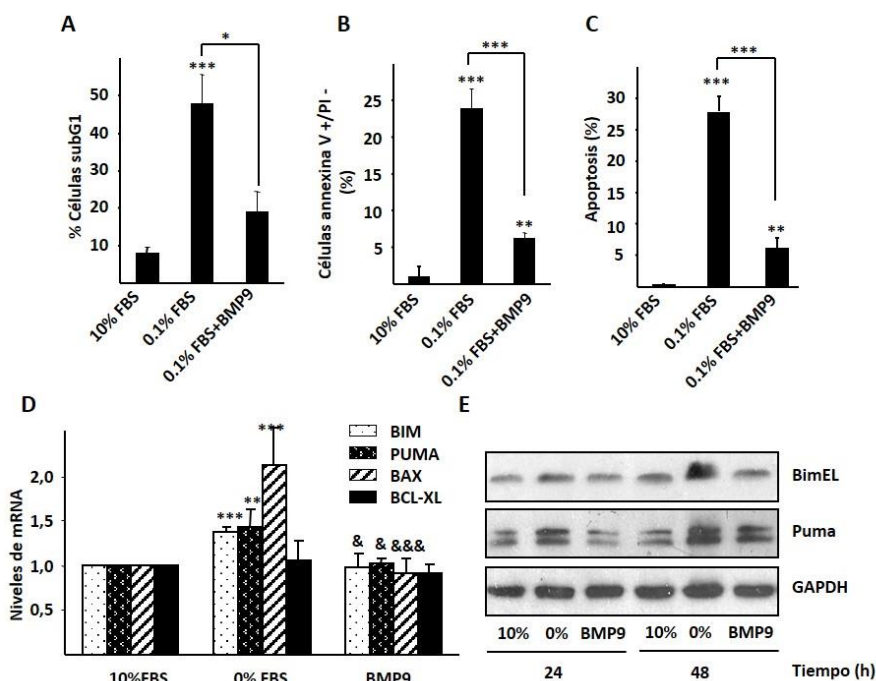


Figura 34. Efecto de BMP9 en la apoptosis inducida por ausencia de suero en células HepG2. A-E. Las células HepG2 fueron incubadas en medio 0% FBS +/- BMP9 (5 ng/ml) o en medio 10% FBS durante 4 días. **A.** Porcentaje de células hipodiploides (apoptóticas). Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **B.** Porcentaje de células apoptóticas (anexina +/yoduro de propidio -). Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **C.** Núcleos apoptóticos determinados mediante tinción con yoduro de propidio. Datos de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **D.** Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de Bim, Puma y Bax. Valores normalizados con Gusb (media \pm S.E.M., n = 4). **E.** Determinación mediante western blot de los niveles de BimEL y Puma a 24 y 48 horas de tratamiento. GAPDH como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$ frente 10%FBS y & = $P < 0,05$; && = $P < 0,01$; &&& = $P < 0,001$ frente a 0% FBS.

Datos previos de la bibliografía habían descrito que la apoptosis inducida por la ausencia de suero en células HepG2 era una apoptosis de tipo mitocondrial, que cursa con pérdida de potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo C de la mitocondria al citosol y con modulación de proteínas de la familia de Bcl-2 (Baek *et al.*, 2000; Bai and Cederbaum, 2006; Zhuge and Cederbaum, 2006; Wang *et*

al., 2008). Quisimos analizar si las proteínas de la familia Bcl-2 eran reguladas en nuestras condiciones de apoptosis y si BMP9 ejercía algún efecto sobre ellas. Nuestros resultados indican que la ausencia de suero no modifica los niveles de expresión de Bcl-xl (miembro con actividad anti-apoptótica) mientras que sí se observó un aumento en los niveles de expresión de mRNA de miembros pro-apoptóticos como Bax y los miembros de la subfamilia “BH3 only”, Bim y Puma. El tratamiento con BMP9 bloquea completamente este efecto (**Figura 34D**). El mismo comportamiento encontramos cuando se analizaron los niveles de proteína: en ausencia de suero se produce una elevación de los niveles de Bim y Puma que es bloqueado cuando las células se tratan con BMP9 (**Figura 34E**).

En conjunto estos resultados apuntan a que BMP9 es un factor capaz de actuar aumentando la proliferación celular y evadiendo la respuesta pro-apoptótica inducida por la baja concentración de suero, y que, por tanto, BMP9 tiene un importante papel en el crecimiento de estas células tumorales hepáticas.

2.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO INDUCIDO POR BMP9 EN CÉLULAS HepG2

A continuación analizamos cuál era la vía de señalización implicada en el crecimiento celular inducido por BMP9 en las células HepG2.

2.1. BMP9 activa vías canónicas y no canónicas en células HepG2

En primer lugar analizamos el papel de la vía canónica en el crecimiento celular inducido por BMP9 en las células HepG2. Para ello realizamos ensayos de silenciamiento con siRNAs que específicamente actúan sobre Smad4. En primer lugar comprobamos los niveles de silenciamiento de Smad4 obtenidos por dos oligos distintos analizando tanto los niveles de mRNA como los de proteína de Smad4. Como se muestra en la figura 13, la expresión del mRNA de Smad4 se redujo en un 60% (**Figura 35A**) y la de proteína en un 30-40% (**Figura 35B**). En estas condiciones, se realizó un ensayo de proliferación y se vio que BMP9 ejerce su efecto proliferativo tanto en células control como en células en las que Smad4 ha sido silenciado (**Figura 35C**), lo que sugiere que el efecto de BMP9, en términos de crecimiento celular, no está mediado por la vía canónica.

Tras descartar la implicación de la vía Smad en el efecto de BMP9 continuamos analizando la regulación por BMP9 de rutas de señalización no canónica o independiente de Smad. De hecho, está descrito en la literatura que las diferentes BMPs pueden señalar a través de vías no canónicas (Herrera *et al.*, 2012). Sin embargo, del papel de las vías independientes de Smad en los efectos biológicos de BMP9 se sabe poco y la mayoría de los datos disponibles hasta este momento provienen de células progenitoras mesenquimales. Así, estudiamos la posible activación por BMP9 de las rutas de PI3K y p38 por BMP9, utilizando para ellos anticuerpos que reconocen la forma fosforilada/activa de Akt y de p38MAPK.

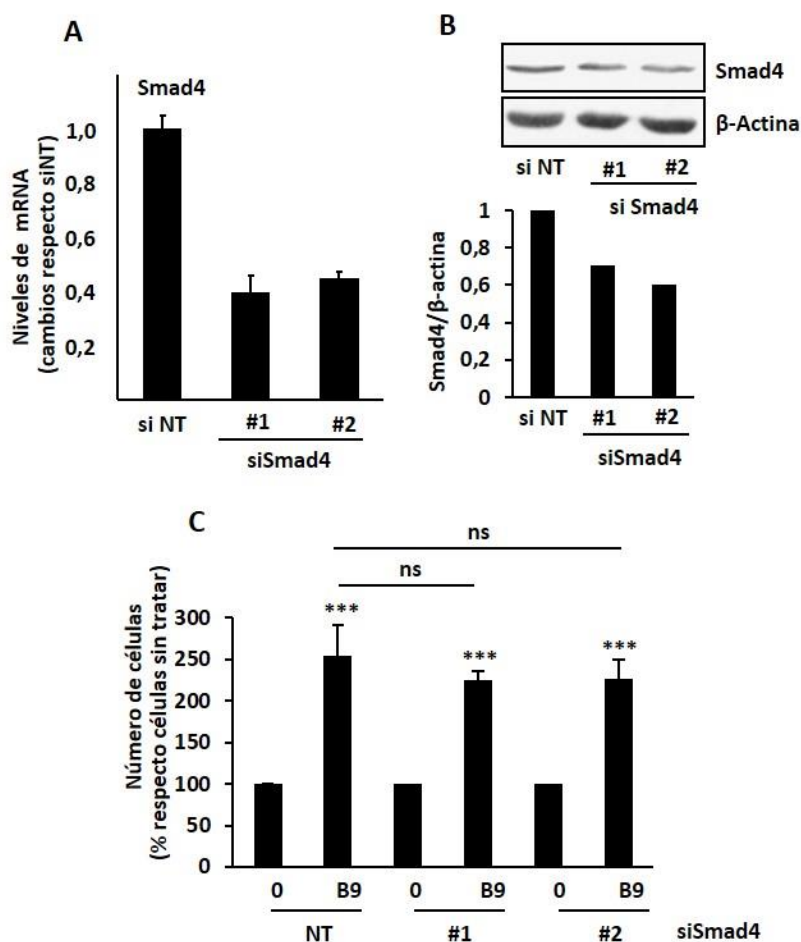


Figura 35. Papel de la señalización de Smad en el efecto proliferativo de BMP9 en células HepG2. A-C. Las células HepG2 fueron transfectadas de forma transitoria con siRNA no silenciante control (siRNA NT) o con dos siRNA de Smad4 diferentes (siRNA Smad4 #1 y #2). Tras 48 horas se llevó a cabo el análisis del silenciamiento **A.** mediante *western blot* utilizando β -actina como control de carga (panel superior). Valores de densidad óptica relativos a cada control y expresados como cambios relativos frente a siRNA NT (panel inferior). **B.** mediante RT-qPCR y normalizado frente a Gus. **C.** Las células fueron incubadas con BMP9 (5 ng/ml) en medio 0% FBS y contadas tras 4 días. Se muestran datos de un experimento representativo de 4 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.D.). *** = $P < 0,001$; n.s. = no significativo.

Se realizaron *western blots* analizando la activación de estas rutas a distintas concentraciones de BMP9 (**Figura 36A**) y a distintos tiempos (**Figura 36B**), las mismas condiciones que las utilizadas para estudiar la activación de las Smads. Nuestros resultados indican que, al mismo tiempo que se observa la activación de Smad1,5,8, BMP9 también activa vías no canónicas como PI3/Akt y p38MAPK. En ambos casos se observa la activación de la ruta a partir de 1 ng/ml de BMP9.

Además, presentan una activación temprana que comienza a los 15 minutos de tratamiento, que varía en el tiempo y que sigue activa tras las 8 horas. En conjunto estos resultados demuestran que BMP9 induce la vía canónica (Smad1,5,8) y vías no canónicas PI3K y p38MAPK en células HepG2.

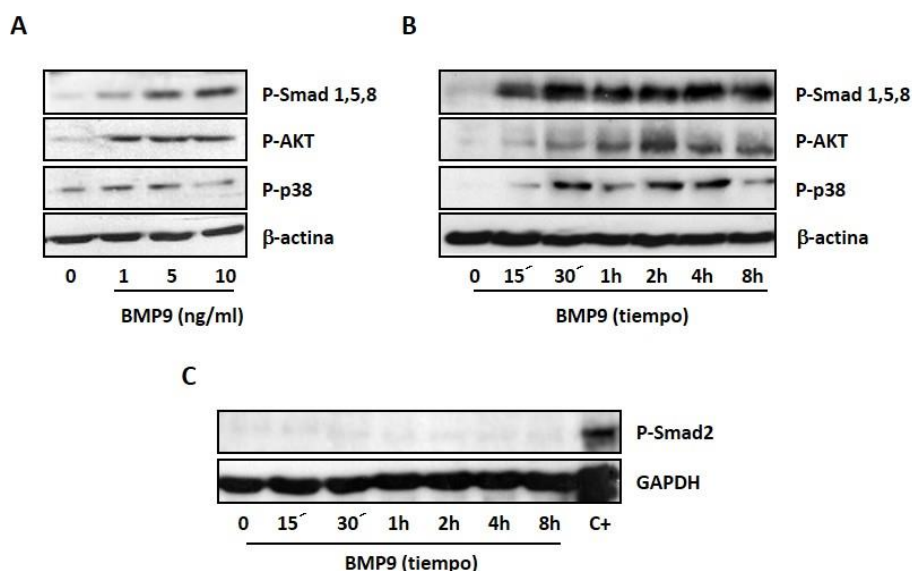


Figura 36. Vías de señalización activadas por BMP9 en células HepG2. A. Las células HepG2 fueron incubadas con BMP9 durante 1 hora a distintas concentraciones (1-10 ng/ml) o B.C. durante diferentes tiempos (5ng/ml) en medio 0% FBS. Se realizaron *western blots* con anticuerpos que reconocen las formas fosforiladas de Smad1,5,8, AKT, p38, Smad2 y como control de carga se analizó β-actina o GAPDH. Se muestra un experimento representativo de 2 (A) o 3 (B,C) realizados.

Datos de la literatura describen que en células endoteliales, BMP9 induce la activación de Smad2/3, la vía clásica de señalización de TGF-β (Scharpfenecker *et al.*, 2007; Upton *et al.*, 2009). Analizamos esta posibilidad y no observamos ningún tipo de activación de esta vía en células HepG2 en nuestras condiciones experimentales (Figura 36C).

BMP9 activa la vía canónica Smad1,5,8 y las vías no canónicas PI3K/Akt y p38MAPK en las células HepG2.

2.2. La vía de PI3K/Akt no está implicada en el crecimiento celular mediado por BMP9 en células HepG2

Para analizar cuál de estas vías está implicada en el efecto sobre el crecimiento celular de BMP9 en nuestro modelo celular, comenzamos analizando el papel de la vía de PI3K/Akt, ya que esta vía está implicada en numerosos procesos celulares relacionados con supervivencia y progresión del ciclo celular (Lin *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014).

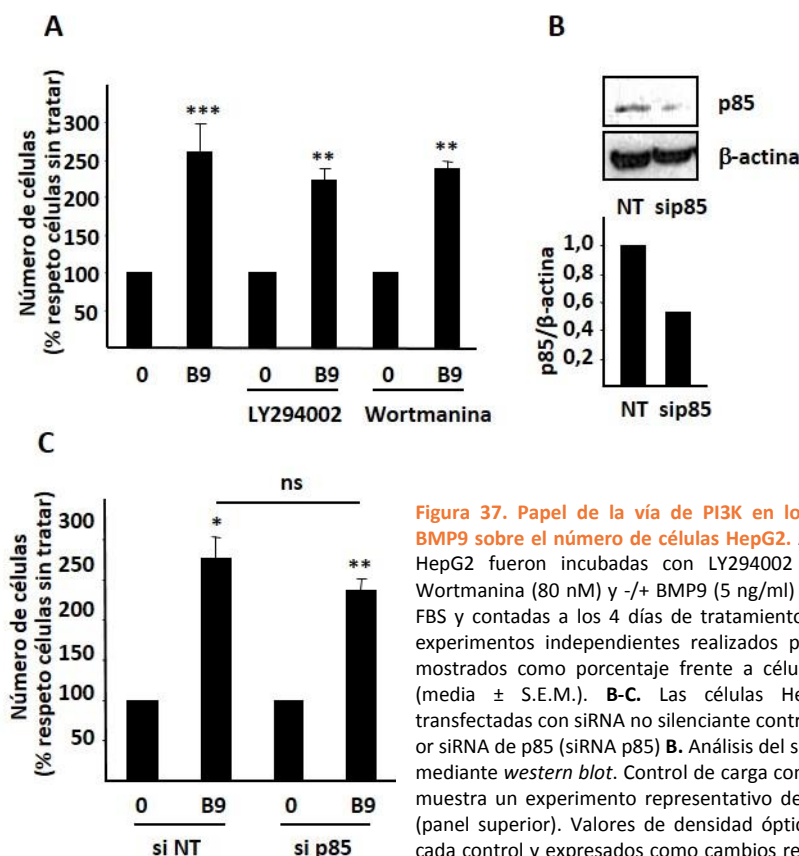


Figura 37. Papel de la vía de PI3K en los efectos de BMP9 sobre el número de células HepG2. **A.** Las células HepG2 fueron incubadas con LY294002 (7.5 μ M) o Wortmanina (80 nM) y \pm BMP9 (5 ng/ml) en medio 0% FBS y contadas a los 4 días de tratamiento. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, mostrados como porcentaje frente a células sin tratar (media \pm S.E.M.). **B-C.** Las células HepG2 fueron transfectadas con siRNA no silenciante control (siRNA NT) or siRNA de p85 (siRNA p85) **B.** Análisis del silenciamiento mediante *western blot*. Control de carga con β -actina. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados (panel superior). Valores de densidad óptica relativos a cada control y expresados como cambios relativos frente a siRNA NT (panel inferior). **C.** Las células fueron incubadas \pm BMP9 (5 ng/ml) en medio 0% FBS y contadas tras 4 días. Datos de un experimento representativo de 4 realizados por triplicado (media \pm S.D.). * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; n.s. = no significativo.

Nuestros resultados indican que la inhibición de la vía PI3K/Akt mediante inhibidores clásicos como LY294002 o Wortmanina no impide el efecto proliferativo de BMP9 ya que el incremento en el número de células obtenido con BMP9 es similar en ausencia y en presencia de éstos (Figura 37A). Estos

datos sugieren que la activación de PI3K no está implicada en el crecimiento celular mediado por BMP9 en células HepG2. Para corroborar estos datos, realizamos ensayos de silenciamiento transitorio con siRNA dirigidos frente a p85 α , la subunidad reguladora de PI3K. En un primer lugar comprobamos que en nuestras condiciones de ensayo se obtenía una reducción del 50% en los niveles de expresión de p85 α (**Figura 37B**). Posteriormente analizamos la respuesta a BMP9 en estas células y observamos que, aún con niveles reducidos de PI3K, BMP9 sigue induciendo un aumento en el crecimiento celular, alcanzando niveles similares a los de las células transfectadas con siRNA no silenciante (**Figura 37C**). Esto corrobora los datos obtenidos con el inhibidor, poniendo de manifiesto de nuevo la falta de implicación de esta vía en el crecimiento inducido por BMP9.

Por tanto, la vía PI3K/Akt no está implicada en el crecimiento celular mediado por BMP9 en las células HepG2.

2.3. La vía de p38MAPK está implicada en el efecto de supervivencia inducido por BMP9 en células HepG2

A continuación analizamos el posible papel de la vía de p38 en el efecto proliferativo inducido por BMP9 en células HepG2. Para ello utilizamos un inhibidor específico de esta quinasa, SB203580. Nuestros resultados demuestran claramente que la inhibición de p38 impide el efecto promotor de crecimiento inducido por BMP9 en células HepG2 (**Figura 38A**). Confirmamos estos resultados mediante ensayos de silenciamiento con siRNA para p38 (**Figura 38B**). Aunque solo se obtuvo una disminución en los niveles de p38 del 30% en nuestras condiciones de ensayo, esta disminución parcial es ya suficiente para bloquear el efecto inducido por BMP9 en el número de células, esto es, en las células en las que se ha silenciado p38 se pierde el efecto promotor del crecimiento celular de BMP9 (**Figura 38C**). Estos datos sugieren que la activación de p38 es necesaria para la acción de BMP9 sobre el número de células HepG2.

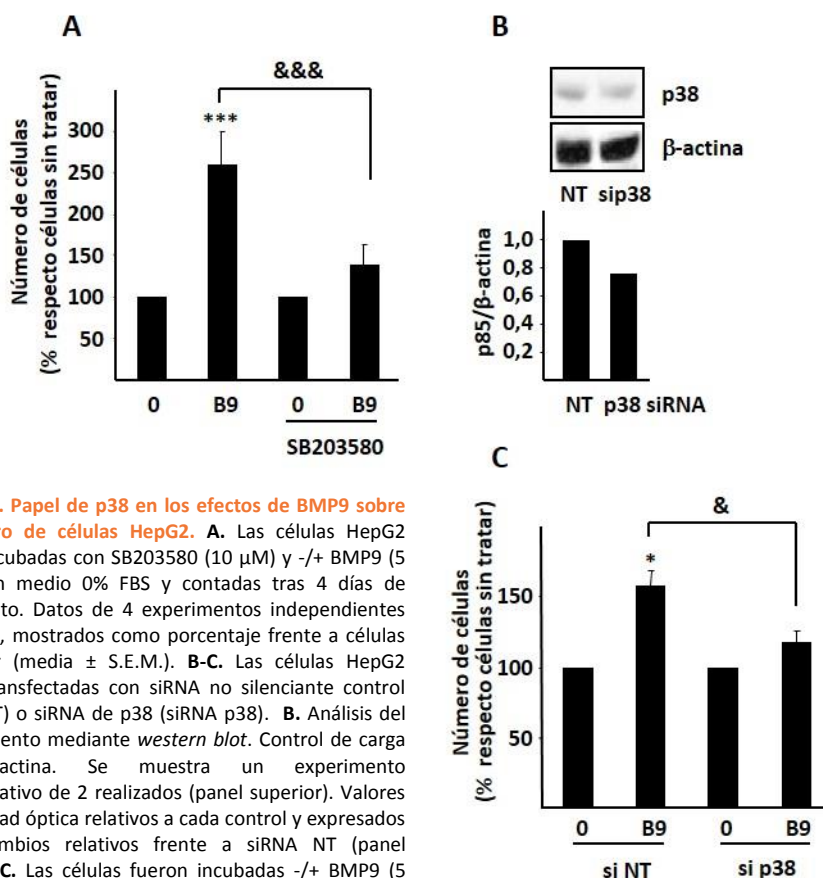


Figura 38. Papel de p38 en los efectos de BMP9 sobre el número de células HepG2. **A.** Las células HepG2 fueron incubadas con SB203580 (10 μ M) y \pm BMP9 (5 ng/ml) en medio 0% FBS y contadas tras 4 días de tratamiento. Datos de 4 experimentos independientes con $n = 4$, mostrados como porcentaje frente a células sin tratar (media \pm S.E.M.). **B-C.** Las células HepG2 fueron transfectadas con siRNA no silenciante control (siRNA NT) o siRNA de p38 (siRNA p38). **B.** Análisis del silenciamiento mediante *western blot*. Control de carga con β -actina. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados (panel superior). Valores de densidad óptica relativos a cada control y expresados como cambios relativos frente a siRNA NT (panel inferior). **C.** Las células fueron incubadas \pm BMP9 (5 ng/ml) en medio 0% FBS y contadas tras 4 días. Datos de un experimento representativo de 3 realizados por triplicado (media \pm S.D.). * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$ o & = $P < 0,05$; &&& = $P < 0,001$.

En un siguiente paso, quisimos saber los mecanismos por los que p38 está mediando este efecto, es decir, si afectaba al efecto proliferativo de BMP9 o al de supervivencia. Para ello, en primer lugar analizamos el efecto de la inhibición de p38 en la proliferación inducida por BMP9 y observamos como el tratamiento con el inhibidor SB203580 no altera el aumento de la proliferación mediado por BMP9, que se midió utilizando varios abordajes: incorporación de timidina tritiada (**Figura 39A**), incorporación de BrdU (**Figura 39B**) o análisis de células en fase S-G2-M mediante citometría de flujo (**Figura 39C**). En todos los casos se observa un mismo resultado, el tratamiento con el inhibidor SB203580 no impide el efecto proliferativo que induce BMP9 en estas células. Estos datos parecen sugerir que p38 no está implicado en el efecto proliferativo de BMP9 en células HepG2.

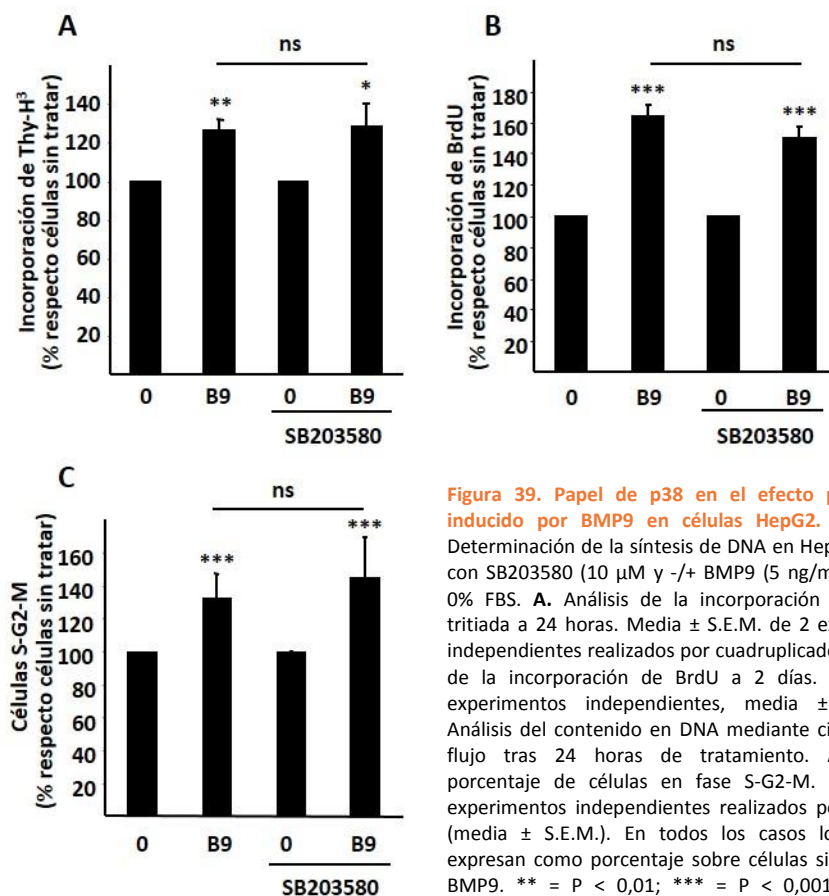


Figura 39. Papel de p38 en el efecto proliferativo inducido por BMP9 en células HepG2. A. B. y C. Determinación de la síntesis de DNA en HepG2 tratadas con SB203580 (10 μ M y +/- BMP9 (5 ng/ml) en medio 0% FBS. **A.** Análisis de la incorporación de timidina tritiada a 24 horas. Media \pm S.E.M. de 2 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. **B.** Análisis de la incorporación de BrdU a 2 días. Datos de 4 experimentos independientes, media \pm S.E.M. **C.** Análisis del contenido en DNA mediante citometría de flujo tras 24 horas de tratamiento. Análisis del porcentaje de células en fase S-G2-M. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). En todos los casos los datos se expresan como porcentaje sobre células sin tratar con BMP9. ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; n.s. = no significativo.

Estudiamos después la posible función de p38 en el efecto de supervivencia de BMP9. Para ello analizamos la población de células apoptóticas mediante análisis de contenido de DNA por citometría de flujo (**Figura 40A**) y conteo de núcleos apoptóticos (**Figura 40B**) en presencia o en ausencia del inhibidor de p38, SB203580. En ambos casos observamos como el pre-tratamiento con el inhibidor de p38 impide el efecto protector de BMP9 frente a la apoptosis inducida por la ausencia de suero. Además, analizamos los niveles de mRNA de los miembros de la familia Bcl-2 que habíamos visto alterados en ausencia de suero y que eran regulados por BMP9. El pre-tratamiento con SB203580 impide la regulación de la expresión de Bim, Puma y Bax por BMP9 los cuales mantienen altos niveles aun en presencia de este factor (**Figura 40C**). Así, estos datos parecen indicar que la inhibición de p38 impide el efecto de supervivencia de BMP9 en la apoptosis inducida por ausencia de suero.

Todos estos datos ponen de manifiesto el papel de p38 en el efecto de supervivencia inducido por BMP9 frente a la apoptosis inducida por ausencia de suero en las células HepG2.

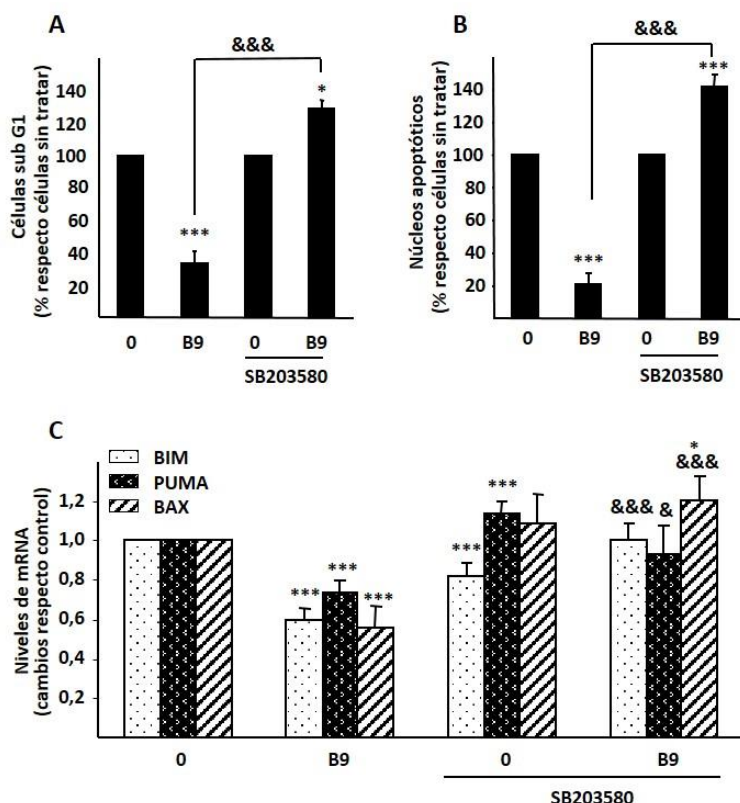


Figura 40. Implicación de p38 en la supervivencia mediada por BMP9 frente a la apoptosis inducida por ausencia de suero en células HepG2. **A-B.** Las HepG2 fueron incubadas con SB203580 (10 μ M) y +/- BMP9 (5 ng/ml) en medio 0% de suero durante 72 horas. **A.** Análisis del contenido de DNA mediante citometría de flujo. Obtención del porcentaje de células hipodiploides (apoptóticas). Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.), expresado como porcentaje sobre las células sin tratar. **B.** Contaje de núcleos apoptóticos tras tinción con yoduro de propidio. Datos de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.) mostrados como porcentaje sobre las células sin tratar. **C.** Análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de Bim, Puma y Bax normalizados con Gusb. Determinación de los cambios relativos frente a 0% de suero (media \pm S.E.M., n = 4). Análisis estadístico * = P < 0,05; *** = P < 0,001 frente a 0% FBS y & = P < 0,05; &&& = P < 0,001 SB203580+BMP9 frente BMP9.

3.

ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA ESTABLE DE CÉLULAS OVALES QUE HA SUFRIDO UN PROCESO DE EMT

Experimentos previos realizados en el laboratorio, como se describe en el apartado de antecedentes del grupo, habían puesto de manifiesto que el TGF- β induce EMT en las células ovas, pero desconocíamos las consecuencias funcionales que este fenómeno podía conllevar. Dado que la EMT puede contribuir tanto a la regeneración tisular como a la fibrogénesis y carcinogénesis, nos pareció interesante estudiar en profundidad los efectos de la EMT en estas células.

3.1. Inducción de EMT crónica en células ovas por tratamiento con TGF- β

En primer lugar, decidimos generar un modelo de células ovas con un fenotipo EMT estable y crónico, dado que en nuestro modelo de inducción aguda de EMT por TGF- β convergen distintos procesos; por un lado, los efectos supresores del TGF- β (inhibición de crecimiento y apoptosis); y por otro, la inducción de EMT, resultando por tanto difícil separar ambas respuestas.

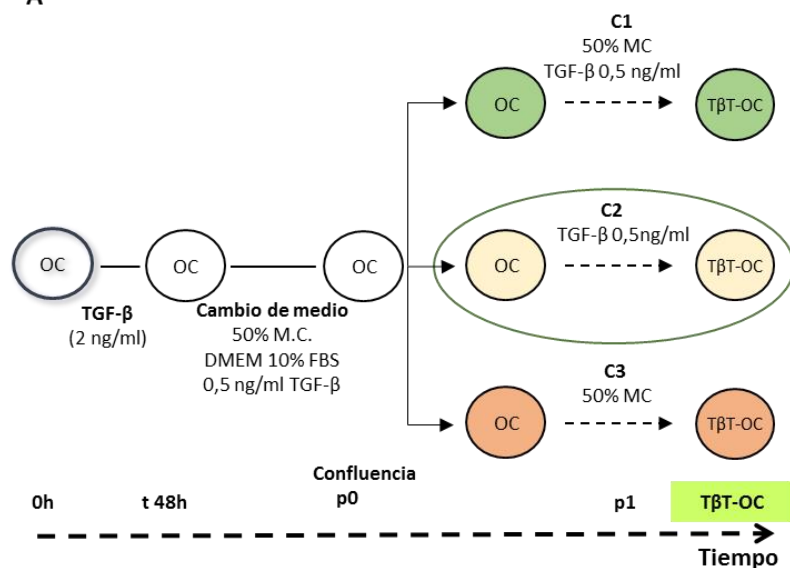
La generación de las células ovas con un fenotipo mesenquimal estable se realizó siguiendo un protocolo similar al utilizado previamente en hepatocitos fetales y células tumorales hepáticas (Valdés *et al.*, 2002; Bertrán *et al.*, 2009). Inicialmente, las células fueron tratadas durante 48 horas con una concentración de TGF- β (2 ng/ml) capaz de inducir una respuesta apoptótica máxima en ausencia de suero. Posteriormente, se realizó el mantenimiento y subcultivo de la población remanente en medio DMEM completo (**Figura 41A**). Para ello, tras 48 horas de tratamiento, tiempo suficiente para una respuesta apoptótica completa, se cambió el medio por otro suplementado con una dosis de mantenimiento de TGF- β (0,5 ng/ml), pero manteniendo un 50% de medio condicionado (M.C.) de las propias células. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90-100% se tripsinizaron y subcultivaron. Observaciones previas en otros modelos celulares habían puesto de manifiesto la posibilidad de un fenómeno de reversión del proceso de EMT tras la retirada del tratamiento con TGF- β . Para intentar evitar este fenómeno y conseguir obtener un protocolo óptimo que permita mantener el fenotipo EMT estable a largo

RESULTADOS

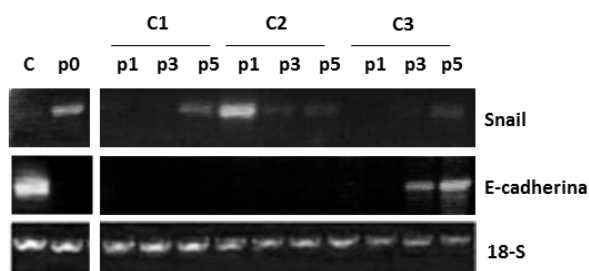
plazo en cultivo, en el momento del subcultivo se testaron varias condiciones de cultivo:

- Condición 1 (C1): dosis de mantenimiento de TGF- β (0,5 ng/ml) y medio condicionado.
- Condición 2 (C2): solo dosis de mantenimiento de TGF- β (0,5 ng/ml).
- Condición 3 (C3): solo medio condicionado.

A



B



C

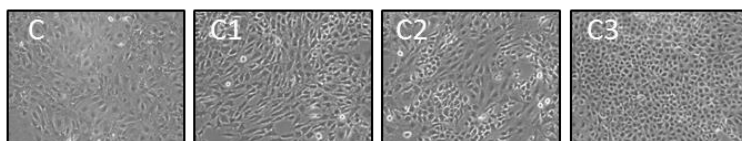


Figura 41. Generación de la línea de células ovas T β T-OC. **A.** Esquema del protocolo de generación seguido. **B.** Análisis mediante RT-PCR de la expresión de Snail y E-cadherina en células T β T-Met^{flx/flx} OC, en las diferentes condiciones de cultivo y a distintos pases. La expresión del RNA ribosomal 18S se usó como normalizador de carga. **C.** Imágenes de microscopía de contraste de fases correspondientes a las líneas celulares T β T-Met^{flx/flx} OC en las tres condiciones de cultivo (C1, C2, C3, pase 5) y a las líneas parentales (Met^{flx/flx}) antes de ser sometidas al proceso de EMT(C).

Las células ovales obtenidas se subcultivaron siguiendo las tres variantes de cultivo y se realizó un análisis de la expresión de marcadores de EMT mediante RT-PCR semicuantitativa (**Figura 41B**). Los resultados corroboran la inducción de la expresión de Snail y la disminución o pérdida de la expresión de E-cadherina tras el tratamiento agudo con TGF- β (p0). Tras el subcultivo de la población remanente, la expresión de Snail sufre fluctuaciones y, aunque se observa expresión en las tres condiciones testadas, la condición que muestra una expresión más estable de Snail es la C2. Además, en estas condiciones, las células presentan un cambio fenotípico muy acusado. Cabe destacar que, a diferencia de las condiciones C1 y C2, en ausencia de dosis de mantenimiento de TGF- β (condición C3), no se consigue una buena EMT, tal como lo demuestra la recuperación de la expresión de E-cadherina, los niveles bajos de expresión de Snail y el mantenimiento de una morfología epitelial (**Figuras 41C**).

En conjunto, estos datos indican la necesidad de tratamiento continuado con TGF- β para conseguir una EMT estable en estas células, a las que denominaremos T β T-OC (de TGF- β *treated oval cells*). Además, la presencia del medio condicionado no parece contribuir de forma aparente al proceso. Tras observar estos resultados se decidió establecer como condiciones de cultivo estándar la variante 2 (C2), con dosis de mantenimiento de TGF- β , evitando así el uso de medios condicionados y con ello la única variable no definida en el proceso.

3.2. La ausencia de c-Met impide la expansión de las células ovales que han sufrido EMT

Este protocolo se usó tanto para las células ovales Met^{fix/fix} como para las Met^{-/-}. Sin embargo, durante el proceso de subcultivo de las células T β T-Met^{-/-} OC observamos que estas células sufrían un proceso de crisis con una aparente inhibición del crecimiento y adquisición de un estado senescente haciendo imposible el establecimiento de una línea estable (**Figura 42A**). Para confirmar estas observaciones llevamos a cabo una tinción de β -galactosidasa asociada a senescencia (**Figura 42B, 42C**). Todas las células T β T-Met^{-/-} mostraron tinción, mientras que en las T β T-Met^{fix/fix} sólo resultaron positivas algunas células de forma puntual, demostrando así que las células ovales carentes de actividad tirosina quinasa de c-Met sufren un proceso de senescencia tras la inducción de EMT. Nuestra primera hipótesis es que esto podría deberse a su mayor sensibilidad a la apoptosis inducida por TGF- β (del Castillo *et al.*, 2008b). Para intentar comprobar esta posibilidad se modificó a cabo el protocolo incrementando el número de células iniciales o incluyendo suero en el medio durante todo el proceso, incluso

durante las primeras 48 horas. Sin embargo, estas variaciones en el protocolo no tuvieron efecto alguno sobre el resultado. A pesar de ello, merece la pena comentar que durante el establecimiento del protocolo en las células $\text{Met}^{-/-}$ aparecieron de forma muy puntual y minoritaria algunas colonias tras 2-3 semanas de cultivo en la condición 2. Una de ellas pudo ser expandida y mantenida en cultivo. Este clon, denominado $\text{sgaT}\beta\text{T-Met}^{-/-}$ (de $\text{T}\beta\text{T-Met}^{-/-}$ with selective growth advantage), presentaba una morfología más epitelial que mesenquimal como se observa en la **Figura 42D**. Ya que desconocemos su verdadero origen y los mecanismos que han llevado a la expansión de estas células decidimos no incluirlas en los estudios posteriores. Por tanto, a partir de ahora los resultados corresponden a la línea $\text{T}\beta\text{T-Met}^{\text{flx/flx}}$. Para simplificar, a partir de ahora nos referiremos a estas células como $\text{T}\beta\text{T-OC}$.

Estos resultados sugieren que la actividad de c-Met es esencial para la expansión a largo plazo de células ovals que han sufrido EMT, ya que su ausencia induce un proceso de senescencia.

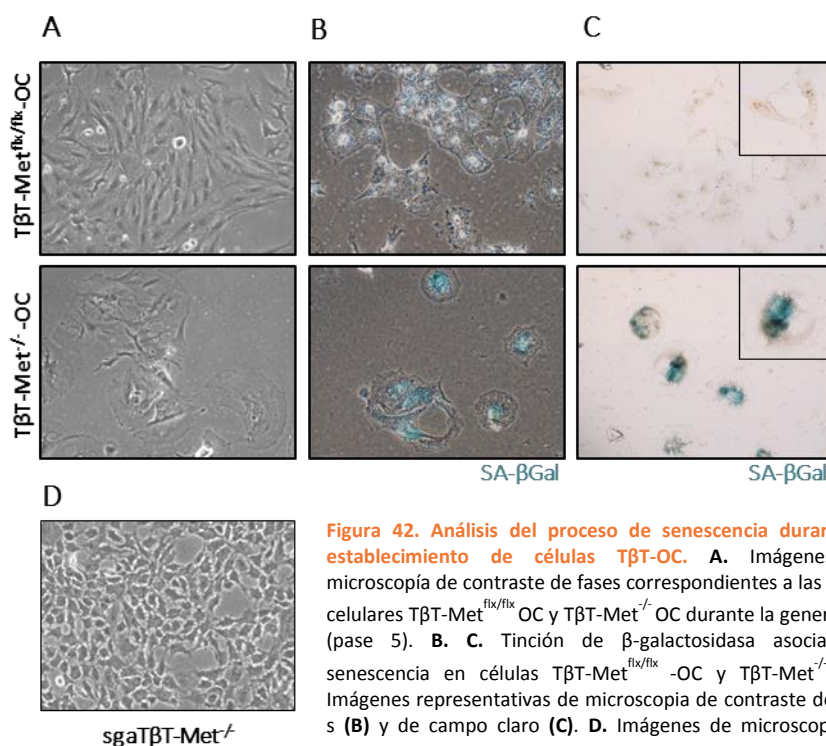


Figura 42. Análisis del proceso de senescencia durante el establecimiento de células $\text{T}\beta\text{T-OC}$. **A.** Imágenes de microscopía de contraste de fases correspondientes a las líneas celulares $\text{T}\beta\text{T-Met}^{\text{flx/flx}}$ OC y $\text{T}\beta\text{T-Met}^{-/-}$ OC durante la generación (pase 5). **B.** **C.** Tinción de β -galactosidasa asociada a senescencia en células $\text{T}\beta\text{T-Met}^{\text{flx/flx}}$ -OC y $\text{T}\beta\text{T-Met}^{-/-}$ -OC. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fase s (**B**) y de campo claro (**C**). **D.** Imágenes de microscopía de contraste de fases del clon aislado de células $\text{T}\beta\text{T-Met}^{-/-}$ OC, $\text{sgaT}\beta\text{T-Met}^{-/-}$ (pase 8). Todas las imágenes fueron tomadas con una magnificación total 100X.

4.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS OVALES QUE HAN SUFRIDO EMT

4.1. Las células ovaes sufren importantes cambios en su fenotipo, su capacidad proliferativa e invasiva y supervivencia tras una EMT crónica

Una vez establecida la línea estable T β T-OC realizamos una caracterización detallada del fenotipo y la funcionalidad de estas células. Incluimos en este análisis líneas estables de T β T-OC; células ovaes tratadas de forma aguda (durante 48 horas) con TGF- β (2 ng/ml), como referencia conocida de la inducción de EMT; y células ovaes sin tratar, como células control.

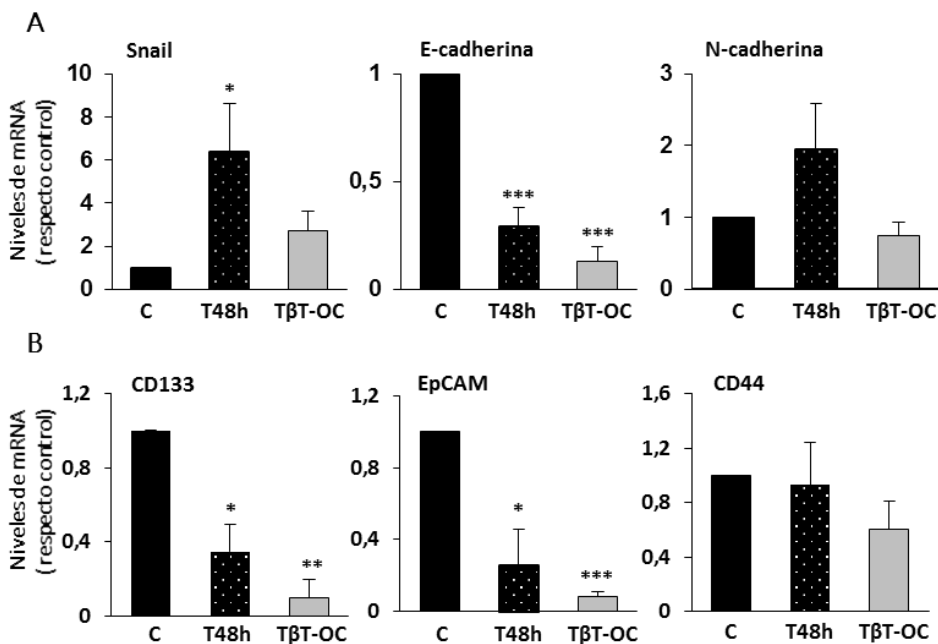


Figura 43. Análisis por RT-PCR cuantitativa del perfil de expresión génica en células ovaes antes y después de la EMT. Análisis de la expresión de distintos marcadores en las OC sin tratar (C), OC tratadas con TGF- β (2 ng/ml) durante 48h y en las células T β T-OC (pase 5). Los resultados se muestran como variación de los niveles de mRNA respecto a las OC sin tratar. **A.** Niveles de expresión de marcadores de EMT. **B.** Niveles de expresión de marcadores de CSC. Datos de 2-4 experimentos independientes (media \pm S.E.M.). Análisis estadístico de las distintas condiciones respecto al control. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

RESULTADOS

En primer lugar, analizamos la expresión de algunos marcadores, tanto de EMT, como Snail, E-cadherina y N-cadherina, para confirmar el mantenimiento del fenotipo EMT (**Figura 43A**); como de marcadores de células madre y de CSC, en particular CD133, EpCAM y CD44 (**Figura 43B**), dado que datos en la literatura han asociado la EMT con la adquisición de propiedades de células madre y/o CSC (Prindull, 2005; Mani *et al.*, 2008; del Castillo *et al.*, 2008a; Nieto, 2013). Los resultados obtenidos demuestran la adquisición de un fenotipo EMT estable, como se refleja en el mantenimiento de la inducción de Snail y la represión de E-cadherina. Sin embargo, curiosamente N-cadherina solo muestra una inducción ligera y transitoria, fenómeno para el cual de momento no tenemos explicación. Por otra parte, observamos que ni la EMT aguda ni la crónica conducen a un aumento en los niveles de los marcadores de CSC, sino que no muestran variación significativa (CD44) o están disminuidos (EpCAM, CD133). Estos resultados, *a priori*, descartarían la conversión de las células ovasales en CSC tras la EMT, al menos en las condiciones de cultivo testadas. .

Dado que uno de los cambios típicamente asociados al proceso de EMT es la adquisición de un fenotipo más migratorio e invasivo, a continuación analizamos la capacidad invasiva de las células realizando ensayos de invasión *in vitro* a través de insertos (*transwells*) cubiertos con matrigel. Los resultados obtenidos (**Figura 44A, 44B**) demuestran que las células T β T-OC tienen aumentada su capacidad invasiva respecto a las OC, demostrando así la relación del proceso de EMT con la ganancia de capacidad invasiva en estas células.

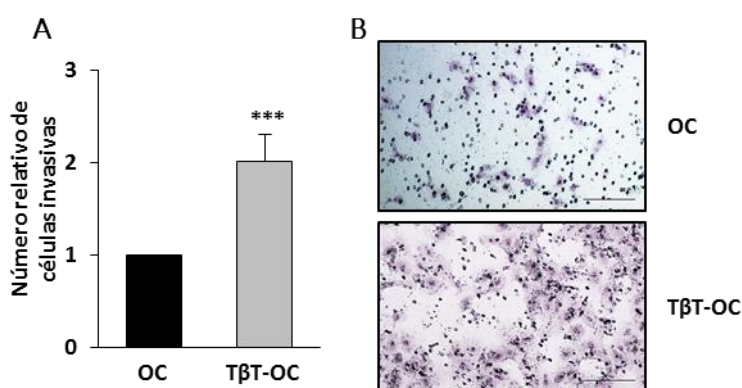


Figura 44. Capacidad invasiva de las células ovasales antes y después de EMT. Ensayo de invasión a través de insertos (*transwells*) cubiertos con Matrigel. **A.** Contaje del número de células que han atravesado la membrana en 40 campos aleatorios y representativos del inserto mediante microscopía de contraste de fases. Los datos se representan como ratio respecto a las OC control. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **B.** Imágenes representativas tomadas con microscopio de contraste de fases de las células que invaden el matrigel teñidas con cristal violeta. Imágenes tomadas con una magnificación total 100X. La barra de escala corresponde a 100 μ m. *** = $P < 0,001$.

Estudios previos en hepatocitos y otras células epiteliales han puesto de manifiesto que el proceso de EMT puede conferir resistencia a la muerte por apoptosis, incluida la inducida por TGF- β (Valdes *et al.*, 2002; Robson *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2010). Para comprobar dicho fenómeno en nuestro modelo celular, realizamos una cuantificación de la apoptosis mediante marcaje con anexina V-FITC (Figura 45A). Los resultados obtenidos muestran que el efecto apoptótico inducido por TGF- β que se observa en las OC tras 24 horas de tratamiento con TGF- β se pierde en la línea T β T-OC. Además, se realizó una cuantificación del índice apoptótico mediante el análisis de núcleos apoptóticos (Figura 45B). Se incluyeron en el análisis células Ras-OC, células ovasles transformadas con el oncogén v-Ha-Ras (ver materiales y métodos). Estas células han sido incluidas en algunos ensayos como modelo de células ovasles tumorales. Ni las células T β T-OC ni las Ras-OC presentaron una respuesta apoptótica en respuesta al tratamiento agudo con TGF- β . Además, se observa incluso una disminución en la apoptosis basal (en ausencia de tratamiento) en ambos tipos celulares, que es más acusada en las células ovasles tumorales. Por tanto, ambos abordajes experimentales demostraron la adquisición de resistencia a muerte de las células T β T-OC, que muestran por tanto un comportamiento similar al de las células ovasles transformadas.

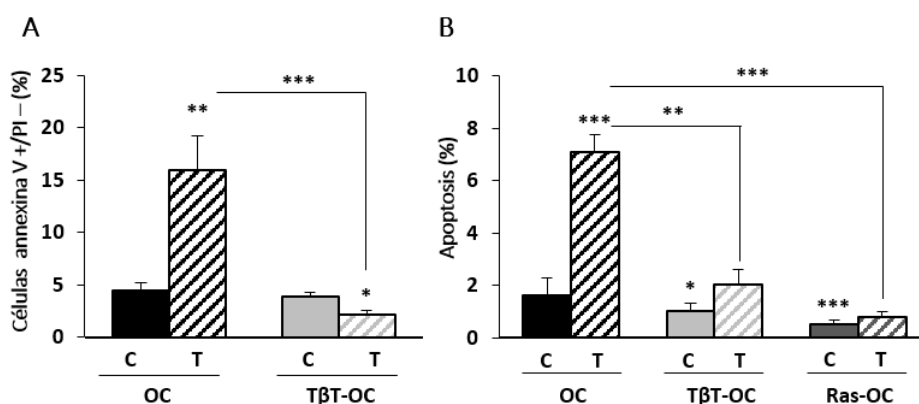


Figura 45. Análisis de la respuesta apoptótica inducida por TGF- β en células ovasles antes y después de EMT. Las células fueron incubadas en medio 0% FBS +/- TGF- β (1 ng/ml) durante 24 horas. **A.** Porcentaje de células apoptóticas (anexina V +/yoduro de propidio -). Datos de 2 experimentos realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **B.** Número de núcleos apoptóticos determinados mediante tinción nuclear con yoduro de propidio y cuantificación por microscopía de fluorescencia. Los datos se expresan como porcentaje de células apoptóticas. Datos de 4 experimentos realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

Con el fin de profundizar en el comportamiento celular en términos de supervivencia en respuesta a la ausencia de factores de crecimiento, cuantificamos el número de células tras dos días en cultivo en ausencia de suero. A diferencia de las OC, en las células T β T-OC no se observó una disminución en el número de células

RESULTADOS

tras 48 horas sin suero (**Figura 46A**). Esto podría estar asociado al fenotipo resistente a muerte (**Figura 45**) pero también a una capacidad proliferativa intrínseca mayor o a una combinación de ambos procesos. Sin embargo, el análisis del número de figuras mitóticas no revela diferencias significativas entre los dos tipos celulares (**Figura 46B**). En conjunto, estos datos sugieren que la falta de pérdida celular en condiciones de ausencia de suero viene dada fundamentalmente por la resistencia a la apoptosis (**Figura 46B**).

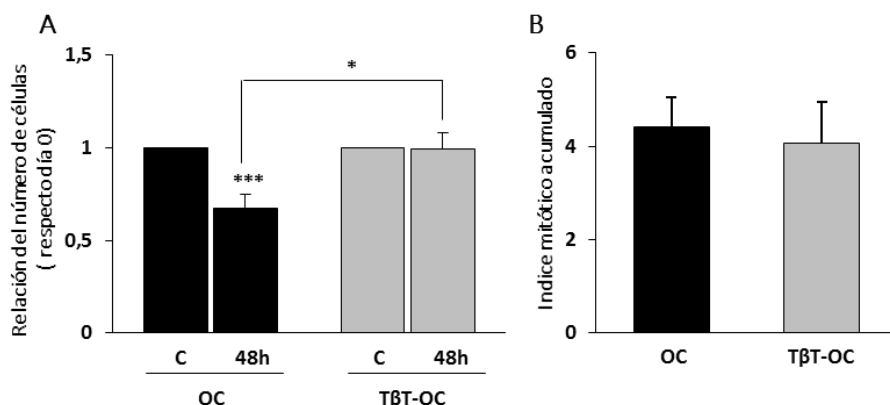


Figura 46. Análisis del número de células e índice mitótico en ausencia de suero en células ovas antes y después de EMT. Las células OC y TβT-OC fueron incubadas en ausencia de suero. **A.** Contaje del número de células tras 48 horas en cultivo. Los datos se expresan como ratio respecto al tiempo 0 de cada línea. Datos de 4 experimentos realizados por triplicado (media ± S.E.M.). **B.** Número de figuras mitóticas determinadas mediante tinción nuclear con yoduro de propidio y cuantificación por microscopía de fluorescencia. Se representa el índice acumulado a 15 y 24 horas. Datos de 2 experimentos realizados por triplicado (media ± S.E.M.). * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.

Por último, para completar la caracterización funcional de las células TβT-OC se analizó su capacidad proliferativa en respuesta a señales mitogénicas, para lo cual se realizaron curvas de crecimiento en cultivo en medio completo (con 10%FBS). En estas condiciones, las células TβT-OC presentan un ritmo de crecimiento similar al de las células que no han sufrido EMT (**Figura 47A**). Sin embargo, como era de esperar, las células ovas transformadas con Ras muestran una mayor capacidad proliferativa. Cuantificamos también el índice mitótico acumulado durante 24h en cultivo en OC y TβT-OC en las mismas condiciones (presencia de suero) y, de nuevo, los resultados no mostraron diferencias entre las células ovas normales y las TβT-OC (**Figura 47B**).

Estos resultados indicarían que las células ovas con el proceso de EMT no han adquirido ventajas frente a sus controles (células ovas antes de sufrir EMT) en términos de proliferación dependiente de anclaje en respuesta a señales mitogénicas presentes en el suero.

Aunque estos análisis parecían indicar que la EMT no conduce a cambios importantes en el crecimiento celular, quisimos analizar el crecimiento independiente de anclaje midiendo la capacidad de formación de colonias en *soft agar*. Como se puede ver en la

Figura 47C, tanto las OC como las T β T-OC son incapaces de crecer y formar focos en estas condiciones, a diferencia de los resultados obtenidos, y esperados, de las células Ras-OC. Estos resultados constituyen una evidencia directa de que una EMT crónica en células ovas no conduce a una conversión maligna.

Por tanto, la EMT inducida por TGF- β en las células OC, lleva consigo cambios fenotípicos y funcionales que las dotan de resistencia a la apoptosis inducida por ausencia de suero y TGF- β y, además, adquisición de una mayor capacidad invasiva. Sin embargo, esto no está asociado a una conversión maligna.

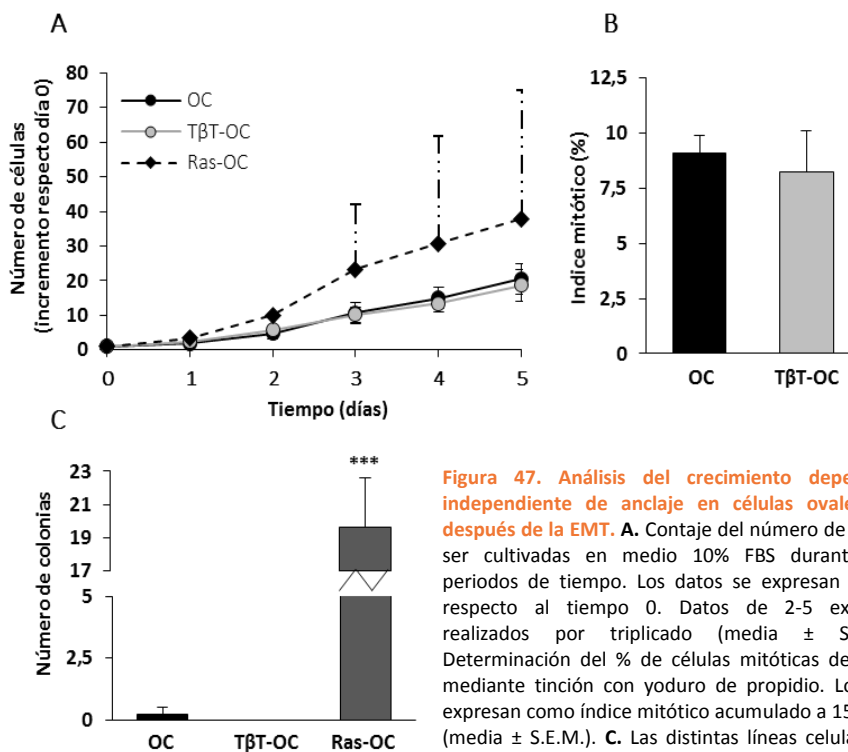


Figura 47. Análisis del crecimiento dependiente e independiente de anclaje en células ovas antes y después de la EMT. A. Contaje del número de células tras ser cultivadas en medio 10% FBS durante distintos periodos de tiempo. Los datos se expresan como ratio respecto al tiempo 0. Datos de 2-5 experimentos realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). **B.** Determinación del % de células mitóticas determinadas mediante tinción con yoduro de propidio. Los datos se expresan como índice mitótico acumulado a 15 y 24 horas (media \pm S.E.M.). **C.** Las distintas líneas celulares fueron sembradas en *soft agar* durante 3 semanas, tras las cuales se realizó un contaje del número de colonias. Datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.). *** = $P < 0,001$.

4.2. Cambios inducidos en la función mitocondrial y el metabolismo oxidativo tras la EMT crónica en células ovals

En los últimos años se ha puesto en evidencia la gran relevancia que tienen los cambios a nivel del metabolismo energético y oxidativo en el fenotipo de las células tumorales y, por consiguiente, en el desarrollo y progresión tumoral (Dang, 2012; Formentini et al., 2010). Además, como ya hemos descrito en la introducción, el estrés oxidativo se ha relacionado con la expansión de células ovals en algunas enfermedades hepáticas. Por otro lado, también hay evidencias de la implicación del estrés oxidativo en la inducción de EMT (Hiraga *et al.*, 2013), pero del papel que juega la mitocondria en este proceso se sabe muy poco.

En primer lugar, y gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Rial en el CIB (CSIC), analizamos el perfil energético celular mediante un analizador Seahorse.

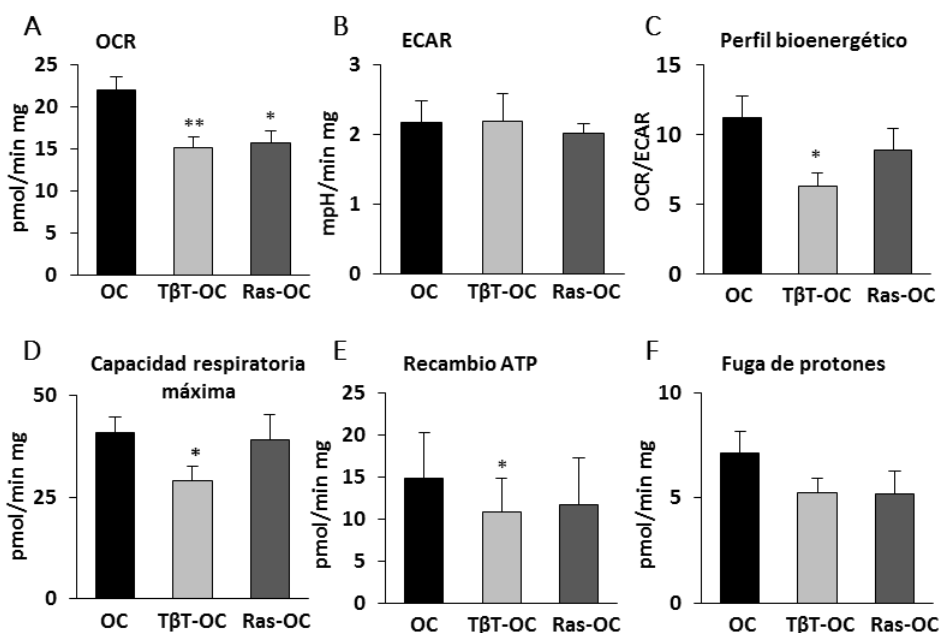


Figura 48. Análisis del perfil metabólico de las células ovals antes y después de EMT. Las células OC, TβT-OC y Ras-OC fueron crecidas en medio 25 mM de glucosa sin suero. Análisis del OCR (A), el ECAR (B), el perfil bioenergético (C), el recambio de ATP (D), la fuga de protones (E) y capacidad respiratoria máxima (F). Datos de 5-10 experimentos independientes con n= 8 (media ± S.E.M.). * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

Los datos obtenidos muestran que las células TβT-OC presentan una tasa de consumo de oxígeno (OCR, de oxygen consumption rate), esto es, una respiración basal, significativamente menor frente a las parentales (Figura 48A). Sin embargo, al analizar la acidificación extracelular del medio (ECAR), parámetro que está

relacionado con la capacidad glicolítica de la célula (Mookerjee *et al.*, 2015), no se observan diferencias entre ambas líneas (Figura 48B). Al hallar el ratio entre la respiración basal y el ECAR con el fin de calcular el perfil bioenergético que caracteriza a estas células observamos que las células post-EMT presentan una relación OCR/ECAR significativamente menor (Figura 48C), sugiriendo que estas células tienen un cambio en su actividad metabólica hacia un perfil más glicolítico. Un estudio más detallado indica además, que estas células tienen una menor capacidad respiratoria máxima, menor recambio de ATP y menor fuga de protones (Figura 48D,E,F). Todos estos parámetros en conjunto parecen indicar una disminución en la función mitocondrial en las células ovals que han sufrido una EMT crónica.

Aunque el perfil general de las TβT-OC es más glicolítico, resultó curioso que a nivel de ECAR no se observaran diferencias entre las distintas líneas. Para intentar confirmar este perfil más glicolítico analizamos la producción de lactato en cultivo y observamos que, efectivamente, las células TβT-OC secretan mayor cantidad de lactato al medio extracelular, evidenciando de forma directa una mayor actividad glicolítica (Figura 49).

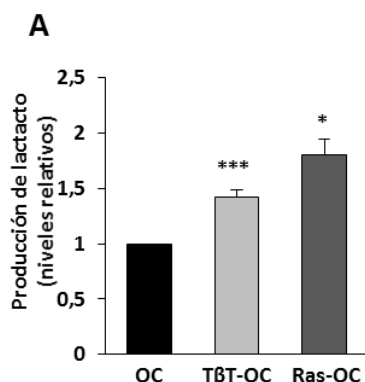


Figura 49. Producción de lactato en las células ovals antes y después de EMT. Análisis de la producción de lactato en las OC, TβT-OC y Ras-OC tras ser cultivadas durante 2 horas en medio 25 mM sin suero. Datos de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (media ± S.E.M.). * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.

Ya que la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo (25 mM) se considera superior a la concentración fisiológica en suero (5 mM = 90 mg/dl) se nos planteó la duda de si las características metabólicas que observamos podrían deberse en parte a las condiciones de cultivo utilizadas, es decir a la concentración de glucosa que reciben las células. Para comprobarlo, se redujo a 5 mM la concentración de glucosa en el medio y repetimos los análisis previamente realizados en el Seahorse.

Las células TβT-OC han adquirido un perfil metabólico más glicolítico determinado por una menor capacidad respiratoria y una mayor producción de lactato.

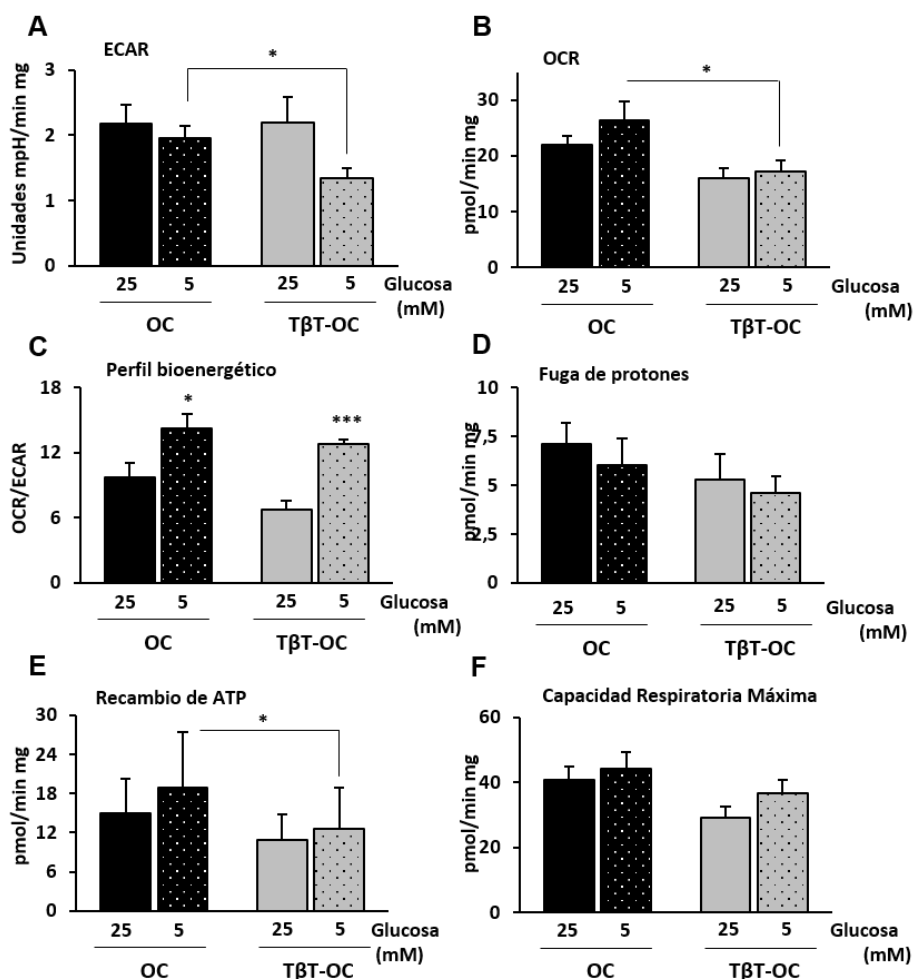
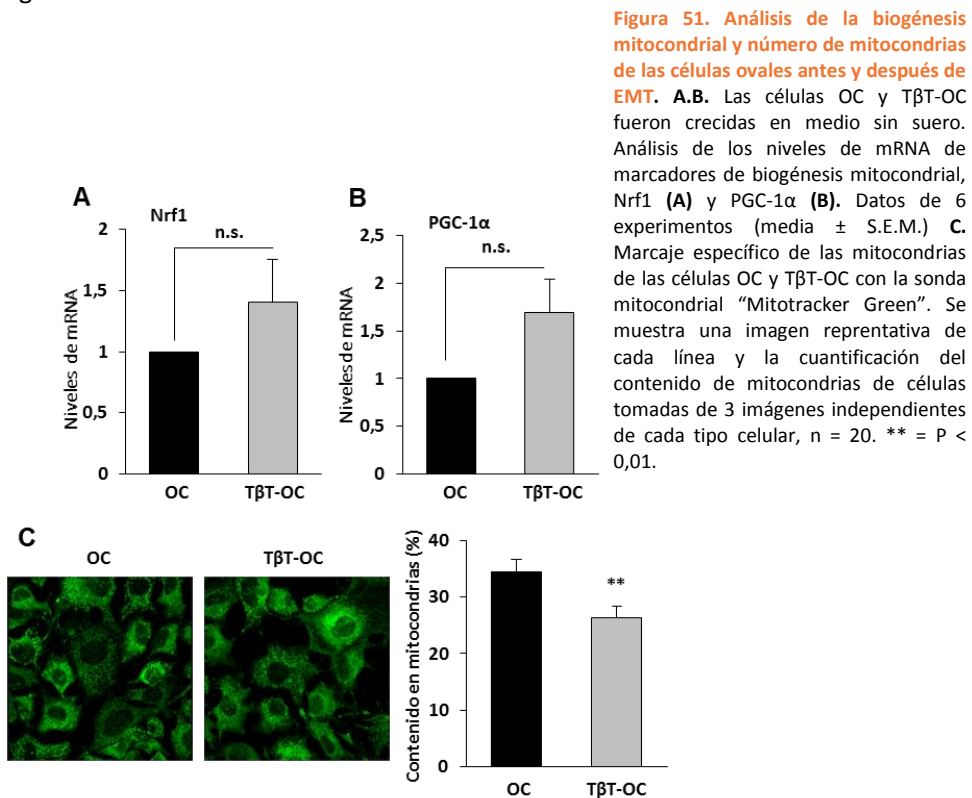


Figura 50. Análisis del efecto de la concentración de glucosa en el perfil metabólico. Análisis del ECAR (A), el OCR (B), el perfil bioenergético (C), el recambio de ATP (D), la fuga de protones (E) y capacidad respiratoria máxima (F) en las células OC y TβT-OC cultivadas en medio 25 o 5 mM de glucosa sin suero. Datos de 5-10 experimentos independientes con n = 8 (media ± S.E.M.). * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

Observamos como, conforme a lo esperado, al disminuir el aporte de glucosa en las OC se reduce el ECAR y aumenta la respiración (Figura 50A, 50B). Las diferencias en estos dos parámetros no alcanzan la significatividad de forma independiente, pero sí cuando se expresa en forma de ratio OCR/ECAR, el cual es mayor en condiciones de glucosa 5mM (Figura 50C). En estas condiciones, el proceso de respiración parece más eficaz dada la disminución de la fuga de protones (Figura 50D), el aumento en el recambio de ATP (Figura 50E) y la capacidad respiratoria máxima (Figura 50F). No obstante los cambios en estos parámetros tampoco son estadísticamente significativos. La respuesta observada al cambio de concentración de glucosa sigue la misma tendencia en ambas líneas celulares aunque en las células que han sufrido EMT algunos cambios son más

exacerbados, en particular el descenso del ECAR y el aumento de la capacidad respiratoria máxima. Estos datos parecen indicar que el perfil metabólico que presentan las T β T-OC se ve más alterado en relación a la concentración de glucosa, siendo, por tanto, más dependiente de la concentración de ésta que las células parentales OC. El descenso acusado del ECAR hace que el perfil bioenergético de las T β T-OC no difiera significativamente al que presentan las OC en estas condiciones de cultivo. No obstante, es evidente que las T β T-OC presentan una respiración, tanto basal como capacidad de respiración máxima, y un recambio de ATP significativamente menores a las OC.



Para analizar más en profundidad los cambios observados en el perfil metabólico mitocondrial entre ambas líneas analizamos posibles diferencias en el número de mitocondrias y en la expresión de genes implicados en biogénesis mitocondrial como PGC-1 α y Nrf1. No observamos diferencias significativas en la expresión de estos dos genes entre ambas líneas (Figura 51A, 51B). Sin embargo, al analizar si había diferencias en el número de mitocondrias en los distintos tipos celulares mediante el marcaje con una sonda específica de este orgánulo, Mitotracker Green, observamos que las T β T-OC presentan un menor contenido en mitocondrias (Figura 51C). Esto podría explicar las diferencias observadas en el perfil bioenergético de las células, en condiciones estándar de cultivo.

RESULTADOS

Datos previos del grupo obtenidos en hepatocitos fetales revelaban alteraciones importantes en el metabolismo oxidativo tras la inducción de EMT por TGF- β (ver apartado de antecedentes del grupo). En base a esto, quisimos llevar a cabo un estudio sobre los posibles cambios producidos a este nivel en las células ovas tras una EMT.

Ya que estudios recientes proponen la implicación del estrés oxidativo en la EMT (Cannito *et al.*, 2010; Hiraga *et al.*, 2013) inducida por TGF- β analizamos el contenido de ROS intracelular.

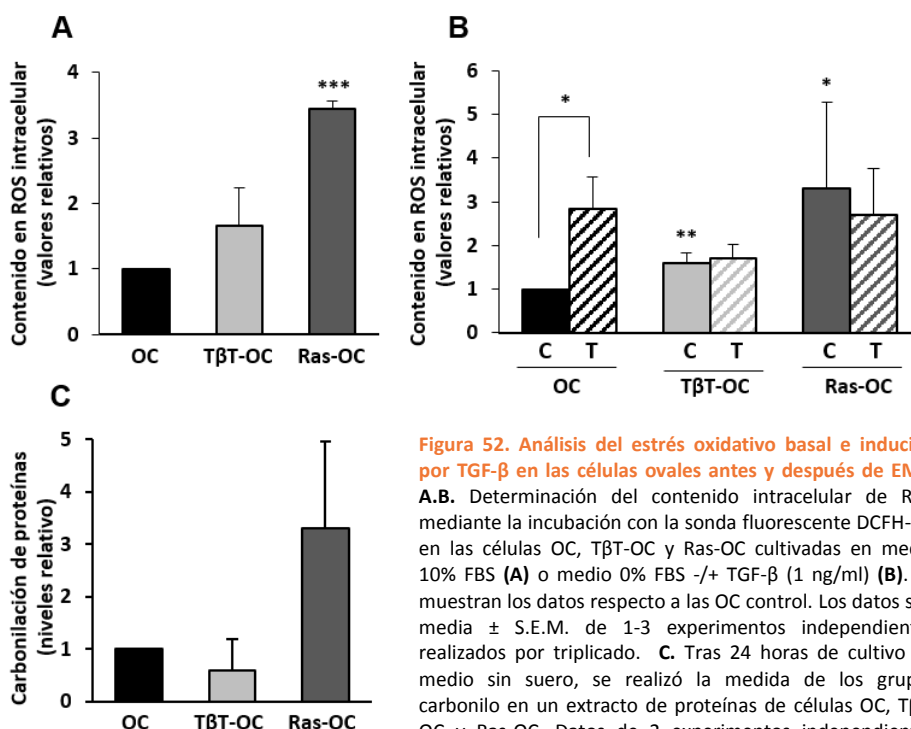


Figura 52. Análisis del estrés oxidativo basal e inducido por TGF- β en las células ovas antes y después de EMT.

A,B. Determinación del contenido intracelular de ROS mediante la incubación con la sonda fluorescente DCFH-DA en las células OC, TβT-OC y Ras-OC cultivadas en medio 10% FBS (**A**) o medio 0% FBS +/- TGF- β (1 ng/ml) (**B**). Se muestran los datos respecto a las OC control. Los datos son media \pm S.E.M. de 1-3 experimentos independientes realizados por triplicado. **C.** Tras 24 horas de cultivo en medio sin suero, se realizó la medida de los grupos carbonilo en un extracto de proteínas de células OC, TβT-OC y Ras-OC. Datos de 2 experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm S.E.M.) * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

Tanto en condiciones basales, es decir en medio completo, como en medio sin suero, las células TβT-OC muestran un mayor contenido en ROS al igual que las Ras-OC (**Figura 52A, 52B**). Como ya hemos descrito en los antecedentes del grupo, el tratamiento con TGF- β aumenta los niveles intracelulares de ROS en las células ovas (Martinez-Palacian *et al.*, 2013). Al analizar este efecto en las células que han sufrido EMT vemos como los niveles de ROS no se ven aumentados con el tratamiento, lo cual podría estar relacionado con la resistencia adquirida a la apoptosis (**Figura 45**) dado que el estrés oxidativo por TGF- β es necesario para la

inducción de apoptosis (Martinez-Palacian et al. 2013). El mismo fenómeno se observa en las células transformadas con Ras.

Además de la medida de ROS intracelulares, analizamos la carbonilación de proteínas, como abordaje para evaluar el grado de daño oxidativo en las células (**Figura 52C**). Curiosamente, a pesar del incremento en los niveles intracelulares de ROS que observamos en las T β T-OC, no detectamos diferencias significativas en la oxidación de las proteínas. En todo caso, hay una tendencia a presentar menor oxidación proteica, lo que sugiere la existencia de mecanismos capaces de contrarrestar los efectos negativos de los ROS producidos por las células. Sin embargo, las Ras-OC tienen unos niveles de carbonilación mucho más elevados, en la misma línea que los niveles de ROS intracelular.

En paralelo analizamos el perfil de expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo, tanto de enzimas productoras de ROS o pro-oxidantes como enzimas encargadas de eliminarlos o antioxidantes.

El análisis a nivel de mRNA muestra que las células T β T-OC presentan un profundo cambio en los niveles de expresión de algunas enzimas relevantes en el metabolismo oxidativo con respecto a las células normales, cuando se cultivan en ausencia de suero. Así, presentan una disminución de los niveles de enzimas antioxidantes como catalasa, SOD2 y Y-GCS; y de enzimas pro-oxidantes como NOX2 y NOX4. La única enzima para la que encontramos niveles aumentados de expresión es la SOD3 (**Figura 53**). Por el contrario, las Ras-OC presentan en general mayores niveles tanto de enzimas pro como antioxidantes respecto a las OC. El tratamiento con TGF- β , utilizado como inductor de estrés oxidativo, en las células OC disminuye la expresión de casi todas las enzimas analizadas, salvo NOX4, que sufre un aumento y SOD3, que no se modula. En las células T β T-OC y las Ras-OC no se observan cambios significativos con el tratamiento, salvo en SOD1, NOX2 y NOX4 en las T β T-OC y en SOD2 en las Ras-OC. La falta de respuesta de las T β T-OC evidenciaría de nuevo una alteración en la respuesta de estas células a un estímulo pro-oxidante y pro-apoptótico. En este sentido, es de destacar que en las Ras-OC el tratamiento con TGF- β no induce la expresión de Nox4, para la cual se ha demostrado un papel clave en la inducción de estrés oxidativo y apoptosis por TGF- β en células hepáticas (Carmona-Cuenca *et al.*, 2008; Crosas-Molist *et al.*, 2014).

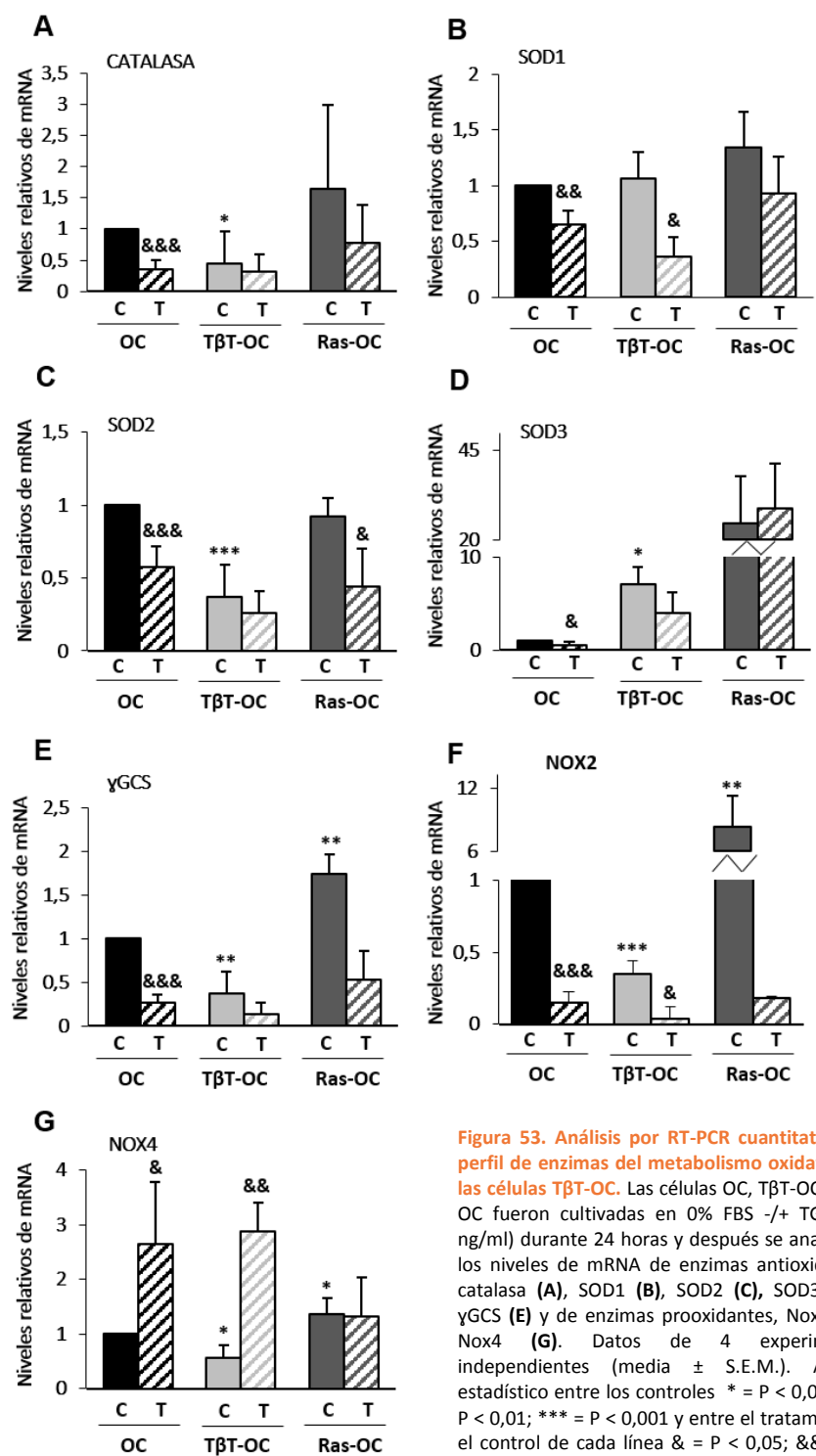


Figura 53. Análisis por RT-PCR cuantitativa del perfil de enzimas del metabolismo oxidativo de las células TβT-OC. Las células OC, TβT-OC y Ras-OC fueron cultivadas en 0% FBS +/- TGF-β (1 ng/ml) durante 24 horas y después se analizaron los niveles de mRNA de enzimas antioxidantes, catalasa (A), SOD1 (B), SOD2 (C), SOD3 (D) y γGCS (E) y de enzimas prooxidantes, Nox2 (F) y Nox4 (G). Datos de 4 experimentos independientes (media ± S.E.M.). Análisis estadístico entre los controles * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001 y entre el tratamiento y el control de cada línea & = P < 0,05; && = P < 0,01; &&& = P < 0,001.

Analizamos estos cambios también a nivel de proteína (**Figura 54**). A 24 horas observamos bajada de expresión de catalasa, γ -GCS y Nox4 en las T β T-OC, existiendo por tanto una correlación entre los datos obtenidos a nivel de mRNA y de proteína. No ocurre lo mismo con SOD2, para la que se observan niveles de proteína incrementados en las T β T-OC respecto a las OC (al contrario de lo observado en mRNA), lo que sugiere una regulación postranscripcional de su expresión. Es interesante destacar que el análisis a tiempos más largos (48 horas) no muestra diferencias significativas entre las células ovaes antes y después de sufrir EMT en la expresión de estas enzimas (catalasa, SOD2, γ -GCS), lo que parece indicar que los cambios observados constituyen una diferente respuesta adaptativa temporal a las condiciones de cultivo. Sin embargo, la expresión de NOX4 es menor en las células T β T-OC a los dos tiempos analizados, por lo que parece una característica específica asociada al fenotipo de estas células. El perfil obtenido en las células transformadas difiere bastante del que presentan las T β T-OC, a excepción de los niveles inducidos de SOD3, lo que parece indicar que el comportamiento redox es muy distinto entre ambas líneas.

Todos estos datos evidencian que la EMT altera el estado redox de las células ovaes resultando en un aumento del contenido en ROS y una diferente respuesta a situaciones de estrés, como la privación de suero y el tratamiento con TGF- β .

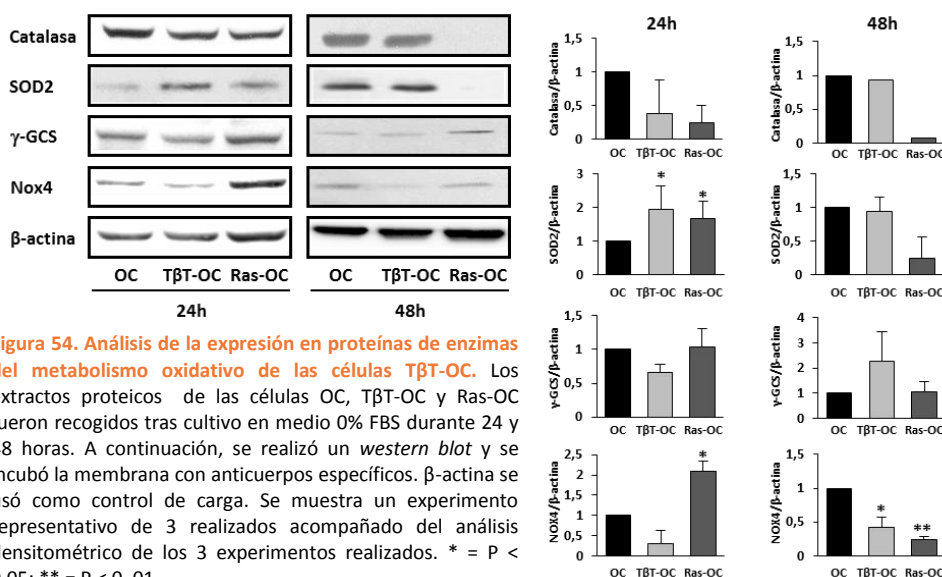


Figura 54. Análisis de la expresión en proteínas de enzimas del metabolismo oxidativo de las células T β T-OC. Los extractos proteicos de las células OC, T β T-OC y Ras-OC fueron recogidos tras cultivo en medio 0% FBS durante 24 y 48 horas. A continuación, se realizó un *western blot* y se incubó la membrana con anticuerpos específicos. β -actina se usó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados acompañado del análisis densitométrico de los 3 experimentos realizados. * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

6. DISCUSIÓN

1. BMP9 EJERCE UN PAPEL PROTUMORIGÉNICO EN CÉLULAS TUMORALES HEPÁTICAS PROMOVRIENDO SUPERVIVENCIA A TRAVÉS DE LA VÍA DE P38MAPK

Diferentes líneas de investigación han puesto de manifiesto la relevancia de la señalización intracelular mediada por BMPs en la función hepática. Está bien establecido el importante papel de las BMPs durante el desarrollo del hígado y la especificación de las células hepáticas (Zaret and Grompe, 2008). En tejido adulto, trabajos de los últimos años revelan un papel central de BMP6 en el control del metabolismo del hierro (Andriopoulos, Jr. *et al.*, 2009; Finberg, 2013), el papel de BMP4 y BMP7 durante procesos de regeneración hepática (Sugimoto *et al.*, 2007; Do *et al.*, 2012) y, probablemente, fibrosis hepática (Tacke *et al.*, 2007; Gressner *et al.*, 2008) y la función pro-tumoral de BMP4 en HCC (Maegdefrau *et al.*, 2009; Maegdefrau *et al.*, 2011). Todos estos estudios señalan al hígado como una importante diana de acción de las BMPs.

En este trabajo nos hemos centrado en estudiar el papel de BMP9, uno de los miembros de la familia de BMPs en la regulación de la función de las células hepáticas, principalmente en la regulación de las células tumorales hepáticas. Aunque originalmente se estableció que BMP9 se expresaba en células no parenquimáticas (Miller *et al.*, 2000), en la actualidad existe cierta controversia sobre el tipo de células hepáticas que lo expresan. Estudios recientes en ratón y en humano ponen de manifiesto que BMP9 es expresado fundamentalmente por hepatocitos y células epiteliales biliares (Bidart *et al.*, 2012). Además de expresar este factor, el hígado es capaz de responder a él, ya que expresa receptores para BMPs como demuestran estudios de RNA en tejido hepático humano donde se ha encontrado expresión de receptores ALK2, ALK3 y ALK6 (receptores tipo I) y ActRIIA (receptores tipo II) (Herrera *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha ido conociendo el papel regulador de BMP9 en diversos procesos celulares en diferentes tipos de células, sin embargo, la función que tiene en células hepáticas es solo parcialmente conocida (David *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012). Concretamente, sobre el papel de BMP9 en hepatocitos solo se conoce el trabajo de Song y colaboradores (Song *et al.*, 1995), según el cual altas concentraciones de BMP9 pueden estimular la proliferación tanto de hepatocitos de rata en cultivo primario como de la línea tumoral HepG2. Nosotros hemos analizado el efecto de BMP9 en diferentes tipos de células hepáticas. En células tumorales hepáticas, BMP9 tiene un efecto promotor del

crecimiento celular que contrasta con el obtenido en células no transformadas de diferente origen. En células ovas de ratón, BMP9 induce una disminución significativa de la viabilidad celular. Estos resultados han abierto una nueva vía de estudio que está actualmente en desarrollo en el grupo con el fin de profundizar en los efectos reguladores de BMP9 sobre estas células y poder determinar su relevancia en la fisiopatología hepática. Por otro lado, en hepatocitos adultos de ratón en cultivo primario el efecto de BMP9 sobre el número de células es más moderado. En hepatocitos adultos humanos THLE3, y en hepatocitos neonatales inmortalizados de ratón no se observa ningún efecto a nivel de proliferación. Además de inducir respuestas distintas en cada línea celular que pueden resultar discrepantes, estos resultados contrastan con los presentados por Song y colaboradores. Una posible explicación podría ser que las células estudiadas tienen diferente origen (humano, ratón y rata) y también las diferencias en las aproximaciones experimentales utilizadas. Sin embargo, en las células tumorales HepG2 nuestros resultados son similares a los publicados previamente por este grupo, aunque el efecto observado es más potente en nuestro caso.

Atendiendo a nuestros resultados en las distintas líneas celulares hepáticas, BMP9 promovería el crecimiento en las células tumorales hepáticas pero no en los hepatocitos no transformados, independientemente del estadio de desarrollo en el que se encuentren. A pesar de que estas células no responden en términos de crecimiento celular, sí que son capaces de responder a BMP9 activando la vía Smad1,5,8. Se desconoce si BMP9 puede regular otros procesos celulares en estas células. Así, podría estar implicada en la regulación de la homeostasis hepática, en procesos en los que se han implicado otros miembros de la familia de las BMPs, como el metabolismo del hierro y la glucosa (Caperuto *et al.*, 2008; Deugnier, 2010). Las diferencias de respuesta a BMP9 en los distintos tipos celulares también podrían deberse a variaciones en los niveles de expresión de receptores entre las células hepáticas que han sufrido transformación y las que no lo han hecho, así como regulación por otros correceptores o diferente regulación en sus vías de señalización.

Nuestros datos también demuestran que BMP9 es capaz de inducir proliferación en células tumorales hepáticas a través de distintos mecanismos de señalización, tanto endocrino (**Figura 31B**), como paracrino (**Figura 23A, 23B**) y autocrino (**Figura 29**). En particular, tanto la inhibición farmacológica de las BMPs con dorsomorfina y LDN193189 como la incubación con ALK1ecd en medio bajo en suero disminuyen el crecimiento de las células HepG2 lo que sugiere la existencia de una producción autocrina de BMP9 en estas células. Este aspecto fue confirmado mediante ensayos de silenciamiento de BMP9; así en condiciones en las que los niveles de expresión de BMP9 están disminuidos se observa una menor

proliferación basal de las células HepG2, quedando demostrado que la producción autocrina de BMP9 sustenta la proliferación de estas células. La adquisición de producción autocrina de factores de crecimiento se ha descrito en células de HCC como un mecanismo para mantener o incrementar sus propiedades tumorales. Así, ligandos de la familia de EGF y sus receptores juegan un papel activo en el crecimiento celular, la regulación de la motilidad y la invasión celular (Sancho and Fabregat, 2010; Hsieh *et al.*, 2011; Sancho and Fabregat, 2011; Caja *et al.*, 2011b). A pesar de que los hepatocitos no expresan HGF, este factor sí que se encuentra expresado en un alto porcentaje de tumores HCC, siendo relevante la implicación del eje HGF/c-Met en la progresión tumoral (Ljubimova *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2001; Horiguchi *et al.*, 2002). El aumento de producción autocrina de TGF- β en las células de HCC (el 40% de los pacientes con HCC presentan mayores niveles de este factor de crecimiento), también se ha relacionado con un papel protumorigénico, promoviendo proliferación e invasión celular (Oishi *et al.*, 2014). La producción autocrina de BMPs está descrita en diferentes tipos de cáncer, como por ejemplo, la sobreexpresión de BMP4 y BMP6 en HCC promoviendo migración, invasión y crecimiento independiente de anclaje (Maegdefrau *et al.*, 2009; Maegdefrau *et al.*, 2011; Maegdefrau and Bosserhoff, 2012). Por tanto, la producción autocrina de BMP9 que describimos en las células HepG2 como mecanismo promotor del mantenimiento del crecimiento dependiente e independiente de anclaje estaría en la misma línea con lo descrito para otros miembros de la familia de las BMPs.

El mecanismo por el cual las células tumorales adquieren una producción autocrina de factores de crecimiento no se conoce con claridad. En el caso de BMP9, se ha visto que éste es producido ya en hígado sano (Herrera *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013), por lo que hipotetizamos que, en el caso de las células de HCC, lo que se produce es un cambio en la respuesta a BMP9, ya que las células tumorales adquieren la capacidad de responder a BMP9 en términos de crecimiento celular.

En cuanto a los mecanismos de señalización que participan en la respuesta a BMP9, no hemos determinado cuál es el tipo de receptor implicado, ALK1 o ALK2. A pesar de que la expresión de ALK1 está restringida a células endoteliales (Cunha and Pietras, 2011), se ha encontrado expresión en células de cáncer de ovario (Herrera *et al.*, 2009), condrocitos (Finnsen *et al.*, 2008) y células hepáticas estrelladas (Wiercinska *et al.*, 2006). Sin embargo, en las células HepG2 no se ha detectado expresión de dicho receptor (Li *et al.*, 2013). Las células HepG2 no expresan ALK1 pero sí ALK2 (Zilberberg *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013) y ya que este receptor es capaz de unir BMP9 en ausencia de expresión de ALK1 en células no endoteliales (Scharpfenecker *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2009), parece lógico pensar que éste sería el encargado de mediar la señalización de BMP9 en nuestro modelo. Otra evidencia que apoya esta hipótesis es el hecho de que dorsomorfina y

LDN193189 actúan sobre los receptores de tipo I, ALK2, ALK3 y ALK6 pero no existen datos sobre su capacidad de inhibir ALK1 (Yu *et al.*, 2008a; Yu *et al.*, 2008b). Dado que tanto dorsomorfina como LDN193189, impiden completamente la señalización y el efecto proliferativo inducido por BMP9 en las células HepG2, parece que es ALK2 el receptor implicado en mediar ambas acciones. No obstante, sería necesario hacer un análisis detallado de la expresión de receptores y co-receptores, así como ensayos de siRNA de los receptores tanto en hepatocitos normales como en transformados para poder determinar este punto con precisión.

BMP9 activa la vía canónica de Smad1,5,8 en células de HCC, la cual regula a su vez la expresión de Id1, diana clásica de la actividad BMP. Sin embargo, a diferencia de otros modelos celulares como el de cáncer de ovario (Herrera *et al.*, 2009), la vía de Smad no parece mediar el crecimiento celular de las células HepG2 ya que, como hemos visto, al silenciar Smad4 no se ve alterado el efecto de BMP9. Por tanto, serían otras vías las implicadas en este fenómeno. Aunque se ha descrito que BMP9 es capaz de promover la fosforilación de Smad2,3 en algunos tipos celulares (Scharpfenecker *et al.*, 2007; Upton *et al.*, 2009), este hecho no se observó en las células HepG2. Estas diferencias pueden ser debidas al diferente origen de las células, células endoteliales *versus* células hepáticas. Por otro lado, nuestros resultados indican que BMP9 también activa vías de señalización no canónicas en las células HepG2, como son PI3K/Akt y p38MAPKs.

La vía PI3K/Akt está altamente relacionada con la regulación del ciclo celular y la supervivencia en un gran número de modelos celulares, incluyendo células hepáticas (Lin *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014). Sin embargo, en nuestro modelo, tanto la inhibición farmacológica como el silenciamiento de p85 demuestran que la vía PI3K/Akt no es la encargada de mediar los efectos proliferativos ni de supervivencia que ejerce el BMP9 en las células HepG2. Dado que BMP9 y la vía PI3K/Akt han sido implicadas de forma independiente en el proceso de EMT en células de HCC, podemos hipotetizar sobre la posible relación de BMP9 con la inducción de EMT en las células HepG2 (Wen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2013).

Otra vía no canónica activada por BMP9 en las células HepG2 es la de la MAPK p38. La activación de esta ruta por BMP9 ha sido descrita en otros modelos celulares, como células endoteliales microvasculares de pulmón, células madre de folículo dental y células de osteosarcoma (Star *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012). En células MPC (*Mesenchymal Progenitor Cells*) BMP9 activa las vías JNKs, p38 y ERKs durante el proceso de diferenciación osteogénica, sin embargo no está claro qué papel juegan cada una de ellas en los efectos de BMP9 (Xu *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012).

Utilizando distintas aproximaciones nuestros resultados apuntan a que la activación de p38 es necesaria para el efecto de BMP9 en el crecimiento de las células HepG2, y específicamente estaría implicada en la protección frente a la apoptosis inducida por la ausencia de suero. Aunque p38 ha sido clásicamente asociada con respuestas de estrés y supresoras de crecimiento, en otras circunstancias, como las células tumorales, se ha descrito el efecto contrario, estando p38 implicada en procesos de supervivencia. Así, en fibroblastos protege frente a daños en el DNA; en neuronas en diferenciación el factor potenciador de miocitos 2, diana de p38, protege a las neuronas de la muerte celular durante la neurogénesis; y en cáncer colorrectal controla autofagia y muerte celular (Okamoto *et al.*, 2000; Heron-Milhavet and LeRoith, 2002; Comes *et al.*, 2007). Recientemente, p38 también se ha implicado en la inducción de un estado de quiescencia en las células tumorales relacionado con un status de supervivencia (Sosa *et al.*, 2011).

Los mecanismos intracelulares que promueve p38 para ejercer sus efectos en supervivencia no se han descrito con detalle. En MEFs p38 regula el ratio Bim/Bcl-xl contribuyendo a la supervivencia frente a la apoptosis inducida por H₂O₂ (Gutierrez-Uzquiza *et al.*, 2010). Nuestros resultados también demuestran que BMP9 regula la expresión de Bim y otros miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 de una forma dependiente de p38 modificando, por tanto, el ratio Bim/Bcl-xl y la apoptosis.

Aunque la implicación de p38 en supervivencia es clara, los mecanismos por los cuales BMP9 promueve proliferación en estas células están por determinar. Habría que explorar en este sentido otras vías de señalización no estudiadas en este trabajo.

Independientemente de los mecanismos implicados, los datos obtenidos remarcan el efecto de BMP9 como inductor del crecimiento en las células tumorales hepáticas, lo que apoyaría un papel pro-tumoral de BMP9 en el HCC. Esto estaría en consonancia con lo observado en muestras de HCC humanos donde se observa una correlación positiva entre los niveles de BMP9, la modulación de marcadores de EMT y la formación de metástasis (Li *et al.*, 2013). Además, la inhibición de la señalización de BMPs reprime el comportamiento migratorio e invasivo de las células de HCC (Maegdefrau and Bosserhoff, 2012). Esto, sumado al efecto proliferativo que describen nuestros resultados remarca un papel protumorigénico de BMP9 promoviendo el crecimiento celular y la formación de metástasis en HCC. Estos resultados estarían de acuerdo con datos de la literatura que demuestran el papel protumorigénico de las BMPs en HCC, como los resultados obtenidos en el laboratorio de la Dra. Bosserhoff, que demuestran que BMP4 y BMP6 se encuentran sobre-expresadas en líneas celulares y en tejidos humanos de HCC. Además, estos autores demuestran que BMP4 tiene funciones autocrinas en las células de HCC

promoviendo invasión y crecimiento independiente de anclaje; y también que actúa de forma paracrina sobre células endoteliales promoviendo angiogénesis (Maegdefrau *et al.*, 2009; Maegdefrau *et al.*, 2011; Maegdefrau and Bosserhoff, 2012). Asimismo, aproximaciones desde la Biología de Sistemas han demostrado la sobreexpresión de BMP4 y BMP7 en cirrosis y cáncer hepático (Lu *et al.*, 2012) y BMP4 ha sido propuesto como marcador predictivo de recurrencia y pronóstico del HCC (Guo *et al.*, 2012).

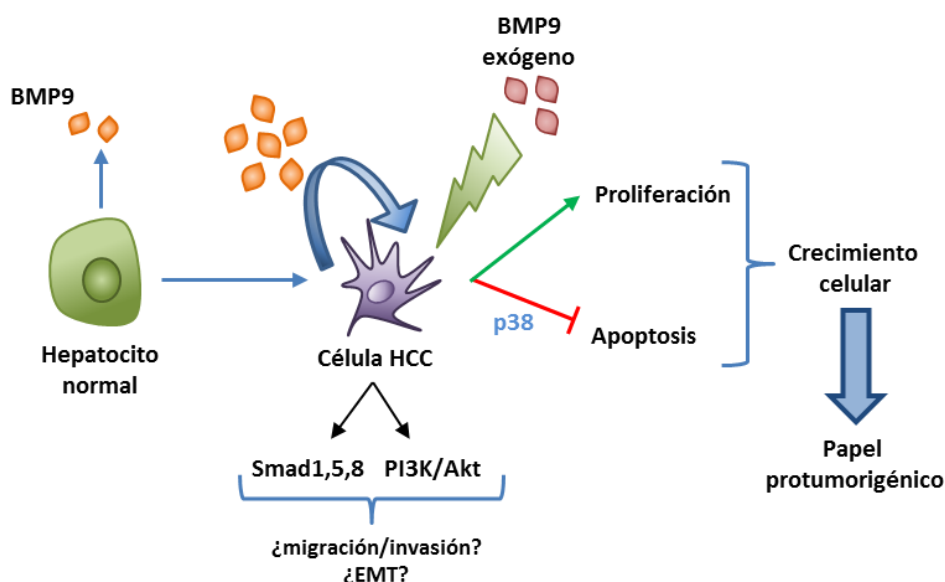


Figura 55. BMP9 ejerce un potente efecto en el crecimiento de células tumorales hepáticas pero no en hepatocitos no transformados. El BMP9, tanto el producido de forma autocrina como el añadido de forma exógena, promueve crecimiento celular mediante la inducción de proliferación (mecanismo sin determinar) y la inhibición de la apoptosis a través de p38MAPK. Además, en estas células BMP9 activa la vía de Smad1,5,8 y PI3K/Akt para las cuales no se ha determinado el efecto que desencadena.

Atendiendo al marco general y a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos hipotetizar que BMP9 podría participar en mecanismos de adaptación frente a condiciones adversas que ocurren en la progresión tumoral, como la falta de factores de crecimiento o de nutrientes (Figura 55). Por ello, BMP9 y más en concreto, su acción vía p38, podría ser propuesto como posible diana terapéutica. De hecho, varias compañías farmacéuticas están desarrollando inhibidores de ALK1 por sus efectos anti-angiogénicos (Cunha and Pietras, 2011) y se han iniciado ensayos clínicos para evaluar los efectos de estos inhibidores en tumores sólidos. Dado que el HCC es un tumor hipervascularizado (Sun and Tang, 2004) y que ALK1 está altamente expresado en los vasos sanguíneos tumorales en hígado (Hu-Lowe *et al.*, 2011), el HCC podría ser un buen candidato al que dirigir esta estrategia

terapéutica. Además, en este caso el tratamiento actuaría también sobre la célula tumoral en sí misma. Para llegar a este punto es necesario seguir avanzando en esta línea de estudio con el objetivo de comprender todos los mecanismos celulares que están participando en este proceso, así como el desarrollo de ensayos adecuados en modelos animales que permitan comprobar esta situación *in vivo*.

2. TGF- β PROMUEVE EN CÉLULAS OVALES UN PROCESO DE EMT ASOCIADO A IMPORTANTES CAMBIOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES. LA VÍA HGF/C-MET ES IMPRESCINDIBLE PARA LA EXPANSIÓN CELULAR POST-EMT

En la segunda parte de los resultados de esta tesis hemos estudiado el efecto a largo plazo del proceso de EMT en células ovas y la posible interacción funcional entre las vías de TGF- β y HGF/c-Met en este contexto.

Existen algunas evidencias en la literatura sobre la capacidad de las células progenitoras hepáticas de sufrir EMT. Así, se ha descrito que células ovas de rata capaces de repoblar un hígado dañado co-expresan marcadores epiteliales y mesenquimales (Yovchev *et al.*, 2008). Asimismo, tanto en un modelo experimental de hígado graso no alcohólico (NAFLD) como en muestras de pacientes con NAFLD se observa expansión de progenitores hepáticos que expresan marcadores de EMT como vimentina (Syn *et al.*, 2009). Además, la inyección subcutánea de células ovas de rata en ratones desnudos da lugar a la formación de tumores con fenotipo mesenquimal (Dong *et al.*, 2009).

En este trabajo, hemos estudiado el proceso de EMT inducido en células ovas por TGF- β , no solo por ser uno de los inductores de EMT en células hepáticas más potentes y mejor estudiados (Pagan *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1999; Valdés *et al.*, 2002; del Castillo *et al.*, 2006), sino, más importante, porque se encuentra aumentado en el ambiente inflamatorio propio de situaciones de daño hepático, las cuales pueden favorecer la expansión de células ovas (Breitkopf *et al.*, 2006; Dooley and ten Dijke, 2012). Hay muy poca información en la literatura sobre el efecto inductor de EMT del TGF- β en células ovas. Mientras Chobert y colaboradores (Chobert *et al.*, 2012) han descrito que las células progenitoras que se expanden en el modelo de daño crónico inducido por tratamiento combinado con CCl₄ y AAF expresan TGF- β pero no expresan marcadores mesenquimáticos, descartando una EMT a través de una señalización autocrina en estas células, otros autores describen un aumento de dichos marcadores tras la exposición de progenitores hepáticos a TGF- β (Deng *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015). Nuestras observaciones en células ovas *in vitro* serían consistentes con estas últimas evidencias confirmando la inducción de EMT por TGF- β . Estos resultados aparentemente contradictorios parecen indicar que la capacidad del TGF- β de inducir EMT en esta población celular es contexto dependiente.

En este trabajo hemos dado un paso más, profundizando en la relevancia de la EMT para el destino de estas células y para ello hemos generado un modelo de inducción de EMT crónica en células ovas. En primer lugar, gracias al uso de mutantes para el receptor c-Met, hemos podido evidenciar el papel crítico que desempeña la señalización a través de este receptor en la expansión a largo plazo de las células ovas tras la EMT inducida por TGF- β , lo que sugiere una cooperación funcional entre las vías de HGF/c-Met y TGF- β en este contexto. Aunque se ha demostrado que la vía HGF/c-Met es esencial en el proceso de regeneración hepática mediada por células progenitoras adultas hepática, de forma que la ausencia de c-Met conduce a un fallo en la respuesta regenerativa y en último término la muerte por fallo hepático (Ishikawa *et al.*, 2012); sin embargo, no se sabe con certeza si la EMT puede contribuir en cierta medida al proceso regenerativo. Por otra parte, la implicación del eje HGF/c-Met en la inducción y/o regulación del proceso de EMT parece compleja. En particular, se ha descrito que c-Met puede tanto inhibir como cooperar en la inducción de EMT mediada por otras señales, como TGF- β o BMPs (Benvenuti and Comoglio, 2007; Ogunwobi and Liu, 2011; Sipos and Galamb, 2012; Lee *et al.*, 2014). Estudios de nuestro grupo han demostrado que el HGF a través de c-Met induce la migración e invasión de células ovas, pero este efecto no requiere una EMT (Suarez-Causado *et al.*, 2015a). Parece, por tanto, que el efecto regulador de HGF/c-Met sobre la EMT es muy dependiente del contexto celular, en el que pueden jugar un papel clave distintos factores, como los niveles de expresión y/o actividad de la vía, la interacción específica con otras vías de señalización y el tipo celular, entre otros.

Nuestro trabajo revela una interesante relación inversa entre la actividad de c-Met y la inducción de senescencia durante el proceso de EMT. Aunque inicialmente cabe pensar que son dos procesos completamente independientes, la relación entre la senescencia y la EMT ha sido descrita por otros autores. Así, la pérdida o supresión de Zeb1 o Twist inicia una senescencia prematura (Brabletz and Brabletz, 2010; Burns *et al.*, 2013). Más concretamente, Ansieu y colaboradores describen como Twist 1 y 2 bloquean las vías supresoras de pRb y p53, pudiendo entonces cooperar con oncoproteínas como H-Ras para inducir una EMT completa y la invasividad celular (Ansieu *et al.*, 2008). En definitiva, nuestros datos proporcionan una evidencia adicional de que superar un fenómeno de senescencia es un paso crítico para la inducción de EMT y/o la progresión celular tras EMT, a la vez que implican a c-Met en este proceso.

Aunque no hemos determinado los mecanismos subyacentes que inducen el proceso de senescencia en células ovas mutantes de c-Met es factible hipotetizar sobre la implicación del estrés oxidativo en este proceso. En este sentido, el TGF- β

ha sido descrito como un inductor de senescencia en distintos tipos celulares, como células de HCC (Senturk *et al.*, 2010), en un proceso dependiente de la generación de ROS mitocondriales. Nosotros hemos demostrado que el TGF- β induce un aumento en la producción de ROS en células ovales, que es clave para la inducción de apoptosis y que está exacerbado en ausencia de un receptor c-Met funcional (Martinez-Palacian *et al.*, 2013). En esta tesis proporcionamos resultados adicionales que revelan que las células que sobreviven a la apoptosis inducida por TGF- β y que sufren EMT tienen un contenido en ROS mayor a las células ovales normales. En base a todo esto, podría pensarse que el propio estrés oxidativo exacerbado inducido por TGF- β en las células deficientes en c-Met provoque un desbalance fatal en el metabolismo oxidativo que resulte en un daño muy acusado e irreversible en el DNA y el consiguiente bloqueo de la replicación o senescencia. Esta hipótesis está siendo actualmente estudiada en nuestro grupo de investigación.

La caracterización fenotípica y funcional detallada de las células ovales con fenotipo EMT nos permite intentar esclarecer la relevancia *in vivo* de este proceso para el destino de estas células en el contexto de daño hepático crónico, más concretamente su posible relación con el desarrollo o la progresión de fibrosis o de HCC (Bi *et al.*, 2012; Xie and Diehl, 2013; Cicchini *et al.*, 2015).

La adquisición de rasgos fenotípicos característicos, como la resistencia a apoptosis o la mayor capacidad migratoria e invasiva sin duda son evidencias de que la EMT en células ovales, al igual que en otros sistemas celulares hepáticos y no hepáticos, conduce a un fenotipo aparentemente más agresivo. Sin embargo, uno de los resultados más llamativos o sorprendentes es la disminución de la expresión de algunos marcadores de CSC (CD133, EpCAM). Estos resultados son discordantes con los que se encuentran en la literatura, que indican que la EMT inducida por TGF- β en células progenitoras hepáticas conlleva la adquisición de marcadores de CSCs (Wu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Esta controversia podría ser debida a diferencias en los modelos experimentales utilizados, ya que en nuestro caso se trata de células de ratón mientras que los datos disponibles en la bibliografía hacen referencia a células de rata. También sería importante analizar los marcadores a más largo plazo, en células de pase más avanzado, por si la adquisición de los marcadores en nuestro modelo es un proceso progresivo y/o más tardío.

Dado que EpCAM es considerado también un marcador de célula progenitora normal no transformada (Mani *et al.*, 2008; Okabe *et al.*, 2009; Yamashita *et al.*, 2009) los resultados podrían interpretarse como una pérdida de la propia identidad de célula oval, es decir, de célula progenitora hepática, y una posible transición a un

estadio previo, de célula madre multipotente. Esto indicaría que la EMT no solo conduce a un retroceso en el proceso de diferenciación al linaje de hepatocitos, como se ha descrito previamente en hepatocitos y células de HCC (Fabregat *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1999; Valdés *et al.*, 2002; Caja *et al.*, 2011a); y como parece ocurrir también en células ovales (resultados no publicados de nuestro grupo), sino una pérdida total del compromiso a linaje hepático. Por otra parte, es importante señalar que EpCAM es una proteína de adhesión propia de células epiteliales, por lo que su disminución sería un indicativo de la pérdida del fenotipo epitelial.

En cualquier caso, tanto el perfil de expresión de marcadores de CSC, como los datos de crecimiento independiente de anclaje, que demuestran que las células TβT-OC, a diferencia de lo que ocurre con las Ras-OC, no tienen capacidad de formar colonias en *soft-agar*, proporcionan evidencias claras de que el tratamiento prolongado con TGF-β y la adquisición de un fenotipo mesenquimal no son suficientes para promover la transformación maligna de la célula oval. Quizá de nuevo es una cuestión de tiempo o más probablemente sea un problema del microambiente celular. Sería interesante realizar ensayos *in vivo* de trasplante celular para ver si en el contexto de un hígado dañado, expuestas a otras señales y alteraciones genómicas y no genómicas, estas células terminarían convirtiéndose en CSCs. En apoyo de esta idea, se ha demostrado que la transducción de la forma oncogénica de Ras (H-Ras) en células progenitoras hepáticas conduce a la adquisición de propiedades de CSC y su capacidad para formar tumores, que curiosamente tienen mayoritariamente un perfil de expresión consistente con un proceso de EMT (Holczbauer *et al.*, 2013).

En los últimos años el estudio del perfil energético de las células ha cobrado especial relevancia. De hecho, la reprogramación metabólica de las células tumorales ha sido incluida en las marcas de identificación de las células tumorales establecidas inicialmente por Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000). Además, dada su relevancia, esta alteración en el metabolismo se propone como diana terapéutica en el proceso tumoral (Wu *et al.*, 2007; Chiaradonna *et al.*, 2012). El análisis del metabolismo energético en nuestro modelo indica que las células TβT-OC tienen un perfil bioenergético más glicolítico, determinado como el ratio OCR/ECAR, medido en el analizador Seahorse. Consistente con este perfil, presentan una mayor producción de lactato. Sin embargo, el análisis detallado de los diferentes parámetros energéticos en el Seahorse revela, como cabría esperar, una tasa menor de consumo de oxígeno (OCR) en las células TβT-OC respecto a las OC normales, pero no muestran diferencias en cuanto a los niveles de acidificación extracelular (ECAR). Esta aparente discrepancia entre el análisis de la acidificación extracelular a través del Seahorse y la cuantificación de la producción del lactato

podría deberse a que, como se ha descrito recientemente, el CO₂ producido en la respiración celular contribuye en parte a la acidificación extracelular (Mookerjee *et al.*, 2015). Por tanto, al tener mayor capacidad respiratoria las OC también tienen una mayor contribución por esta parte al ECAR que las TβT-OC. Esto podría hacer que, a pesar de tener una menor glicolisis, no se observen diferencias en el ECAR entre ambas líneas celulares. Para confirmar esto habría que realizar aproximaciones experimentales adicionales que nos permitan estimar la proporción real de ECAR que se debe a respiración y a glicolisis. No obstante, en su conjunto, los análisis realizados hasta el momento son consistentes con un cambio en el metabolismo energético en las células ovas tras la EMT, de forma que las células se vuelven menos dependientes de su capacidad mitocondrial y más dependientes de la utilización de glucosa.

La menor capacidad respiratoria de las TβT-OC podría estar asociada a un menor contenido mitocondrial por célula, en base a los resultados obtenidos usando la sonda específica mitocondrial MitoTracker. Sin embargo, sorprende que no haya un descenso en la expresión de genes claves para la regulación de la biogénesis mitocondrial en las células TβT-OC. No tenemos una explicación clara para estos resultados, aunque no es la primera vez que se describe una ausencia de correlación entre estos parámetros. Concretamente, estudios previos realizados en un modelo experimental de NAFLD mostraban una falta de correlación entre la expresión de los mRNAs de PGC-1 y Nrf-1 y el contenido en DNA mitocondrial hepático (Carabelli *et al.*, 2011). Se necesitarían más estudios para esclarecer los mecanismos que median los cambios a nivel mitocondrial.

Independientemente de los mecanismos, la adquisición de un perfil metabólico más glicolítico en células TβT-OC se aproximaría al cambio metabólico observado en células tumorales, conocido como efecto Warburg (Warburg, 1956). Según este efecto, las células normales diferenciadas obtienen la energía que necesitan para sus procesos celulares de la fosforilación oxidativa mitocondrial, mientras que las células tumorales lo hacen de la glicolisis aerobia. Este fenómeno está descrito en distintos tipos de tumores, entre ellos el HCC (Wu *et al.*, 2007; Formentini *et al.*, 2010; Dang, 2012). Nuestros resultados también revelan este proceso en las Ras-OC. Aunque, como ya se ha discutido previamente, las células TβT-OC no presentan un fenotipo maligno, es indiscutible que la menor dependencia de consumo de oxígeno les debe conferir una ventaja *in vivo* para su expansión y supervivencia en un ambiente hipóxico, como el que existe en el hígado con daño crónico (Nath and Szabo, 2012).

El análisis de parámetros relacionados con el metabolismo oxidativo de las células también ha proporcionado datos interesantes. Por una parte, las células ovas con fenotipo EMT muestran mayor contenido basal de ROS, de forma similar a lo observado anteriormente en hepatocitos fetales que han sufrido EMT inducida por TGF- β (del Castillo *et al.*, 2008a). Sin embargo, a diferencia de éstos, las T β T-OC a pesar de su mayor contenido en ROS no presentan mayores niveles de proteínas carboniladas, lo que sugiere la existencia de mecanismos capaces de contrarrestar los efectos negativos de los ROS producidos por las células. En este sentido, queda mucho por hacer para clarificar los mecanismos de protección antioxidante activos en estas células. El análisis de la expresión de algunas enzimas antioxidantes no ofrece un panorama muy esclarecedor. Dejando a un lado los cambios temporales de expresión a nivel de mRNA, que no parecen ofrecen una imagen global, sino más bien una visión temporal probablemente reflejo de una respuesta adaptativa a la falta de suero, lo más interesante sería el aumento en la expresión de SOD3, a falta de confirmar con análisis de los niveles de proteína, y la disminución de los niveles de Nox4.

La SOD3 ya ha sido propuesta como posible diana terapéutica en casos de daño hepático debido a su papel clave en la protección frente a estrés oxidativo en hígado producido por una sobredosis de paracetamol, isquemia-reperfusión o intoxicación con D-galactosamina y Lipopolisacárido (Laukkanen *et al.*, 2001; Wheeler *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004).

En cuanto a la Nox4, la coexistencia de niveles aumentados de ROS con menores niveles de expresión de Nox4, junto al hecho de que, aun siendo las células T β T-OC resistentes a los efectos apoptóticos del TGF- β , sigue observándose una inducción significativa de la expresión de Nox4, a nivel de mRNA, en respuesta al tratamiento, ponen de manifiesto una aparente disociación entre Nox4 y los efectos apoptóticos de TGF- β en estas células. Ciertamente, las NOXs, concretamente Nox4, tienen múltiples acciones, que pueden resultar contradictorias. Sabemos que a través de la producción de ROS, media la apoptosis inducida por TGF- β en hepatocitos y células de HCC (Carmona-Cuenca *et al.*, 2006; Caja *et al.*, 2009), e induce parada del ciclo celular en células de HCC a través de la inducción de senescencia (Senturk - et al, 2010; Crosas-Molist et al, 2014). Esto, junto al hecho de que su expresión está fuertemente inhibida en situaciones proliferativas fisiológicas hepáticas, como la regeneración tras PH (Crosas-Molist *et al.*, 2014), otorga un papel esencial a Nox4 en la inhibición del crecimiento en el hígado. Sin embargo, también puede contribuir a la inducción de EMT por TGF- β en diferentes tipos de células epiteliales (Boudreau *et al.*, 2012; Hiraga *et al.*, 2013) aunque no en hepatocitos (Sancho et al, 2012). Además, las NOXs, incluida la Nox4, juegan un

papel clave en la inducción de fibrosis hepática (De Minicis *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2011; Paik and Brenner, 2011; Paik *et al.*, 2014).

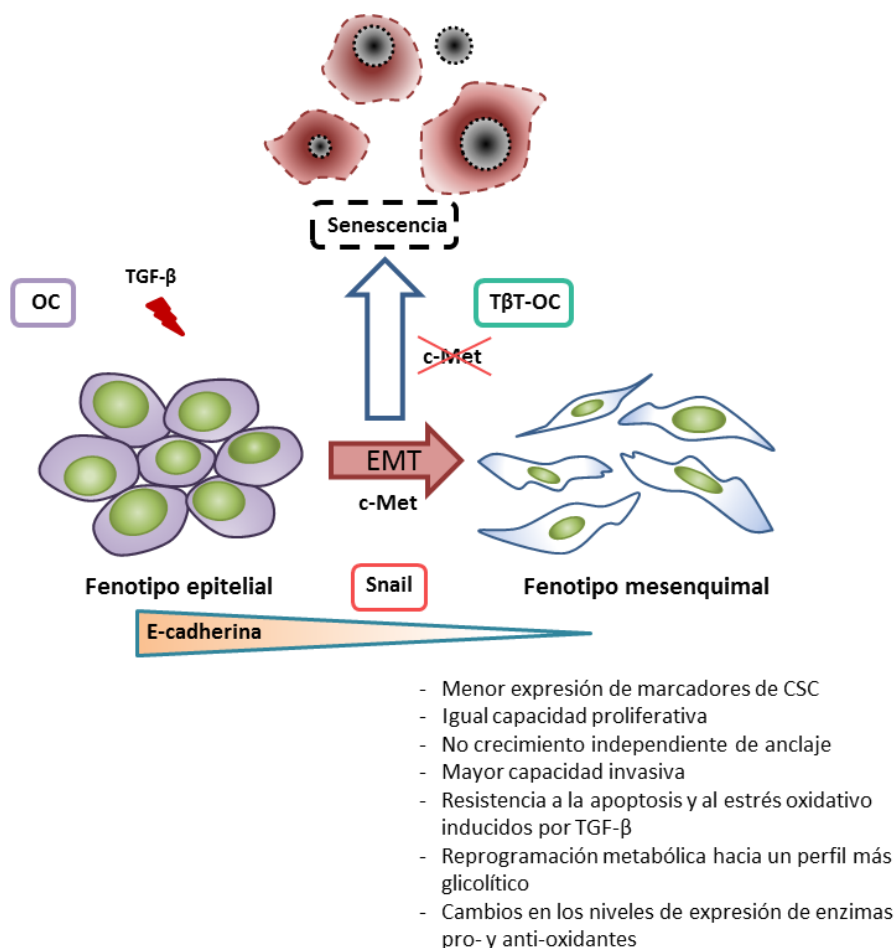
Dado el papel inhibitor del crecimiento de Nox4, podemos pensar que la disminución de su expresión podría facilitar la progresión de las células tras la EMT. No obstante, su implicación en la inducción de EMT y de procesos de migración y diferenciación celular (Cucoranu *et al.*, 2005; Boudreau *et al.*, 2014), hace que las funciones de Nox4 en las células T β T-OC y el papel concreto que juegan los ROS en las mismas no sean obvios y abren un interesante campo de estudio.

Además, hay otros sistemas antioxidantes celulares que no se han estudiado en esta tesis y que podrían ser dianas interesantes, como las tioredoxinas, dada su capacidad para revertir cambios por oxidación en proteínas, entre otros mecanismos de protección frente a estrés oxidativo (Watson *et al.*, 2004). De hecho, se ha demostrado su efecto protector frente al daño oxidativo hepático causado por CCl₄ (Isoda *et al.*, 2006).

En definitiva, como se mencionaba antes, esta parte del trabajo, que es potencialmente muy interesante, queda abierta a futuros estudios. No podemos olvidar que la expansión de las células ovals se produce en un contexto de daño hepático que implica estrés oxidativo. De hecho, cuanto mayor daño y más estrés oxidativo, mayor es la expansión de estas células, llegando a proponerse que la expansión de células ovals es un componente de la respuesta adaptativa del hígado al estrés oxidativo (Roskams *et al.*, 2003). Esto por sí mismo implica que estas células deben poseer mecanismos que les confieran protección en estas condiciones. Algunos, como las proteínas de la familia de MRP (Multidrug Resistance Proteins), ya se han identificado (Ros *et al.*, 2003) y otros están por determinar.

En resumen, nuestro trabajo demuestra que el TGF- β induce un proceso de EMT en células ovals, asociado a importantes cambios fenotípicos y funcionales (**Figura 56**). El TGF- β se comportaría de forma similar a lo descrito en otros modelos celulares, de forma que mientras que a corto plazo actúa como un supresor, a través de la inhibición del crecimiento y la inducción de apoptosis, tanto *in vitro* (Nguyen *et al.*, 2007; del Castillo *et al.*, 2008b) como *in vivo* (Preisegger *et al.*, 1999), a largo plazo, en células que han sobrevivido a este efecto supresor y que han sufrido EMT, induce un fenotipo más agresivo, evidenciado por la resistencia a muerte, la mayor capacidad invasiva y un cambio metabólico hacia un fenotipo más glicolítico. Esto podría ser *a priori* consistente con ese cambio de papel, de supresor a promotor tumoral, otorgado al TGF- β y conocido como “paradoja del TGF- β ” (Tian and Schiemann, 2009). Sin embargo, nuestros datos revelan que la EMT *per se* no

conlleva la transformación maligna de las células ovas. Apoyándonos en resultados preliminares del grupo que mostraban que *in vivo*, células ovas que han sufrido EMT poseen mayor capacidad de integrarse y expandirse tras su trasplante en hígado dañado, podemos pensar que, *a priori*, los cambios funcionales observados *in vitro* podrían ser los encargados de conferir una ventaja a estas células para la repoblación hepática. Futuros estudios permitirán aclarar si estas células también pueden contribuir o no, a más largo plazo, a la progresión del proceso fibrótico o si pueden convertirse en CSC.



¿Mayor capacidad de repoblación?

¿Transformación maligna?

Figura 56. El TGF-β promueve un proceso de EMT en células ovas asociado a importantes cambios fenotípicos y funcionales. La vía de HGF/c-Met es imprescindible para la progresión de estas células en cultivo. Todos los cambios inducidos por la EMT pueden alterar y modificar el destino de estas células. La relevancia *in vivo* de dichos cambios en la determinación del destino de las células en el hígado dañado y por tanto en la evolución del proceso regenerativo está aún por determinar.

3. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo hemos estudiado la implicación de dos factores de crecimiento (BMP9 y TGF- β) en la regulación de la biología y función de las células hepáticas, concretamente células tumorales y células progenitoras, y su relevancia en los procesos de hepatocarcinogénesis y/o regeneración.

Por un lado, hemos determinado el papel de BMP9 como agente inductor de crecimiento celular mediante dos mecanismos: la inducción de proliferación celular y supervivencia frente a la apoptosis inducida por suero. Como hemos visto, estos efectos son específicos de las células transformadas. Aunque BMP9 es capaz de activar Smad1,5,8; PI3K/Akt y p38 en las células HepG2, sólo la vía de p38 estaría mediando el efecto antiapoptótico de BMP9 frente a la ausencia de suero. Queda pendiente, por tanto, determinar los mecanismos que regulan el efecto proliferativo, así como las actividades biológicas reguladas por las vías de señalización de Smads y PI3K/AKT.

Estos datos sumados a los descritos por otros grupos que determinan la implicación de BMP9 en la formación de metástasis y la inducción de EMT (Li *et al.*, 2013); así como el aumento de expresión de BMP9 en muestras de HCC (Herrera *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013) sirven para demostrar la participación de BMP9 en la progresión tumoral; y nos llevan a proponer a BMP9 como una señal pro-tumoral en HCC que facilita la progresión tumoral. Estudios como el nuestro encaminados a dilucidar los mecanismo de acción que median sus acciones pueden ser sin duda de gran utilidad en el diseño de abordajes terapéuticos.

Por otra parte, hemos caracterizado las consecuencias fenotípicas y funcionales de la inducción de un proceso de EMT por TGF- β en células progenitoras adultas hepáticas. Hemos evidenciado por primera vez que la ausencia de actividad tirosina quinasa de c-Met induce un proceso de senescencia celular que impide la progresión tras la EMT. Los mecanismos responsables de dicho proceso, concretamente la posible implicación del estrés oxidativo, están bajo estudio en estos momentos. Las células que se expanden tras la EMT tienen un fenotipo más agresivo, como lo demuestra la adquisición de resistencia a la apoptosis y el estrés oxidativo inducidos por TGF- β , la mayor capacidad invasiva y la reprogramación metabólica hacia un perfil más glicolítico. Sin embargo, las células no expresan marcadores de CSCs y no adquieren capacidad de crecimiento independiente de anclaje, descartando una transformación maligna. Además, nuestro trabajo proporciona algunas posibles dianas para investigaciones futuras sobre los mecanismos responsables de los cambios celulares, como son las SODs, en

particular la SOD3, y la Nox4, abriendo así nuevas líneas de investigación futuras. Queda también pendiente para el futuro el estudio de la relevancia de estos hallazgos para la función y destino de la célula oval *in vivo*, en el contexto de un hígado dañado, concretamente en qué medida pueden contribuir al proceso regenerativo, o al desarrollo y/o progresión de la fibrosis y de un proceso tumoral.

En conjunto, creemos que este trabajo contribuye de forma importante a la caracterización de nuevas señales y mecanismos implicados en la regulación de la función de las células tumorales y progenitoras hepáticas, que pueden ser útiles para avanzar en el conocimiento de la patología hepática, lo que a su vez es fundamental para el diseño de terapias adecuadas (Figura 57).

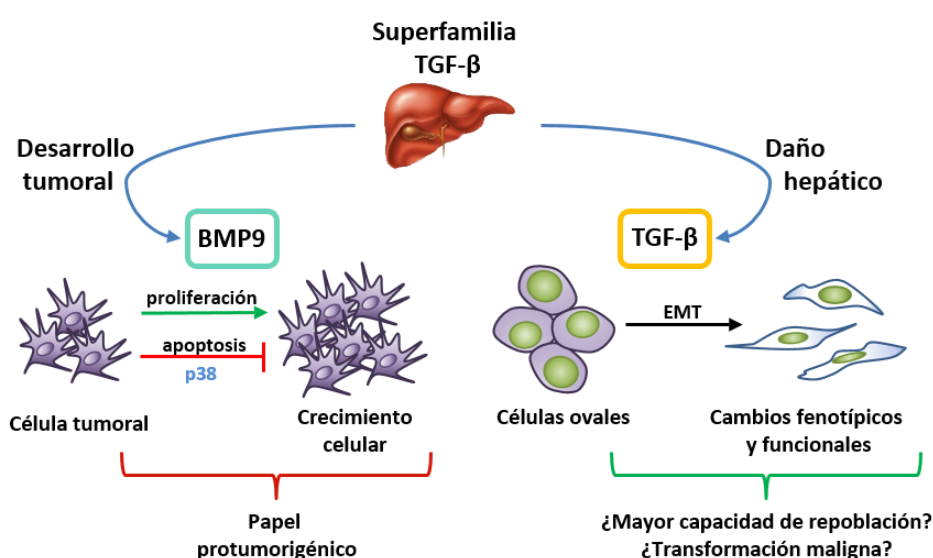


Figura 57. Relevancia de la superfamilia del TGF- β en el contexto hepático. BMP9 en el desarrollo tumoral participa favoreciendo el crecimiento del tumor mediante la inducción de proliferación y la inhibición de apoptosis (vía p38) en condiciones de ausencia de suero, sugiriendo el papel protumorigénico de BMP9 en el tumor hepático. Además, en condiciones de daño hepático, el TGF- β del ambiente inflamatorio es capaz de inducir en las células ovas un proceso de EMT que conlleva asociado numerosos cambios fenotípicos y funcionales que pueden proporcionar a estas células ventajas adaptativas en el proceso de repoblación del tejido dañado o bien ser el inicio del proceso de transformación maligna.

7. CONCLUSIONES

1. BMP9 promueve crecimiento celular en líneas tumorales hepáticas, pero no en células hepáticas no transformadas. Además, las células HepG2 poseen una producción autocrina de BMP9 que sustenta su crecimiento basal.
2. El crecimiento inducido por BMP9 en las células HepG2 se debe a una doble acción, ya que actúa promoviendo la proliferación celular y la evasión a la respuesta pro-apoptótica inducida por la baja concentración de suero.
3. En células HepG2, BMP9 dispara la vía de señalización canónica Smad1,5,8 y también vías de señalización no canónicas como PI3K/Akt y p38MAPK.
4. Las vías de Smad1,5,8 y PI3K/Akt no parecen estar implicadas en los efectos de BMP9 sobre crecimiento celular. Sin embargo, la ruta de p38 MAPK es necesaria para el efecto de supervivencia de BMP9 frente a la apoptosis inducida por la ausencia de suero en células HepG2.
5. TGF- β es capaz de inducir un proceso de EMT estable en las células ovals. La ausencia del receptor de HGF, c-Met, impide la expansión a largo plazo de las células ovals tras la EMT.
6. Las células ovals que han sufrido una EMT (T β T-OC) adquieren resistencia a la apoptosis y al estrés oxidativo inducidos por TGF- β , así como una mayor capacidad invasiva.
7. La EMT no confiere ventajas proliferativas a las células ovals ni la capacidad de crecer de forma independiente de anclaje. Esto, junto a la menor expresión de marcadores de células madre del cáncer (CSC), descarta una posible transformación maligna tras la EMT.
8. La EMT conlleva profundos cambios en el metabolismo energético celular, concretamente la adquisición de un perfil más glicolítico y una disminución de la capacidad respiratoria mitocondrial.
9. La EMT altera el metabolismo oxidativo celular. Las células T β T-OC presentan mayor contenido en ROS y una alteración en los niveles de expresión de enzimas pro- y anti-oxidantes, destacando la inducción de SOD3 y la disminución de Nox4.

CONCLUSIÓN FINAL

El presente trabajo contribuye al conocimiento de las señales y mecanismos implicados en la regulación de las células tumorales y progenitoras hepáticas y su relevancia en el proceso de hepatocarcinogénesis y regeneración hepática. Describimos a BMP9 como una nueva señal pro-tumoral en HCC y por ello la proponemos como nueva diana terapéutica de esta patología. Por otro lado, demostramos que el TGF- β induce un proceso de EMT en las células progenitoras hepáticas que conlleva profundos cambios fenotípicos y funcionales. Dicha conversión fenotípica podría conferir una ventaja a las células favoreciendo su expansión durante el daño hepático crónico. Aunque no se han encontrado evidencias de una transformación maligna in vitro, no se puede descartar que en el microambiente alterado del hígado dañado la EMT pueda también contribuir a la progresión de la fibrosis hepática y/o al desarrollo tumoral.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akhurst, B., E.J.Croager, C.A.Farley-Roche, J.K.Ong, M.L.Dumble, B.Knight, and G.C.Yeoh. 2001. A modified choline-deficient, thionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology* 34:519-522.
- Alison, M.R., and M.J.Lovell. 2005. Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif.* 38:407-421.
- Alison, M.R., S.Islam, and S.Lim. 2009. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J. Pathol.* 217:282-298.
- Anderson, M.E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 111-112:1-14.
- Andriopoulos, B., Jr., E.Corradini, Y.Xia, S.A.Faasse, S.Chen, L.Grgurevic, M.D.Knutson, A.Pietrangelo, S.Vukicevic, H.Y.Lin, and J.L.Babitt. 2009. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat. Genet.* 41:482-487.
- Ansieau, S., J.Bastid, A.Doreau, A.P.Morel, B.P.Bouchet, C.Thomas, F.Fauvet, I.Puisieux, C.Doglioni, S.Piccinin, R.Maestro, T.Voeltzel, A.Selmi, S.Valsesia-Wittmann, F.C.Caron de, and A.Puisieux. 2008. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14:79-89.
- Apte, U., M.D.Thompson, S.Cui, B.Liu, B.Cieply, and S.P.Monga. 2008. Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology* 47:288-295.
- Azad, N., Y.Rojanasakul, and V.Vallyathan. 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit Rev.* 11:1-15.
- Baek, J.H., J.E.Jang, C.M.Kang, H.Y.Chung, N.D.Kim, and K.W.Kim. 2000. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 19:4621-4631.
- Bai, J., and A.I.Cederbaum. 2006. Overexpression of CYP2E1 in mitochondria sensitizes HepG2 cells to the toxicity caused by depletion of glutathione. *J. Biol. Chem.* 281:5128-5136.
- Barneda-Zahonero, B., A.Minano-Molina, N.Badiola, R.Fado, X.Xifro, C.A.Saura, and J.Rodriguez-Alvarez. 2009. Bone morphogenetic protein-6 promotes cerebellar granule neurons survival by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Mol. Biol. Cell* 20:5051-5063.
- Batlle, E., E.Sancho, C.Franci, D.Dominguez, M.Monfar, J.Baulida, and H.A.Garcia De. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2:84-89.
- Becker, R., B.Luthgens, F.Oesch, H.P.Dienes, and P.Steinberg. 1996. Ha-rasVal12 but not p53Ser247 leads to a significant neoplastic transformation rate of the putative rat liver stem cells (oval cell). *Carcinogenesis* 17:2635-2640.
- Bendell, J.C., M.S.Gordon, H.I.Hurwitz, S.F.Jones, D.S.Mendelson, G.C.Blobe, N.Agarwal, C.H.Condon, D.Wilson, A.E.Pearsall, Y.Yang, T.McClure, K.M.Attie, M.L.Sherman, and S.Sharma. 2014. Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumor activity of dalantercept, an activin receptor-like kinase-1 ligand trap, in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res* 20:480-489.
- Benvenuti, S., and P.M.Comoglio. 2007. The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J. Cell Physiol* 213:316-325.
- Bernard, D.J., S.C.Chapman, and T.K.Woodruff. 2001. An emerging role for co-receptors in inhibin signal

- transduction. *Mol. Cell Endocrinol.* 180:55-62.
- Bertrán, E., L.Caja, E.Navarro, P.Sancho, J.Mainez, M.M.Murillo, A.Vinyals, A.Fabra, and I.Fabregat. 2009. Role of CXCR4/SDF-1 alpha in the migratory phenotype of hepatoma cells that have undergone epithelial-mesenchymal transition in response to the transforming growth factor-beta. *Cell Signal.* 21:1595-1606.
- Bidart, M., N.Ricard, S.Levet, M.Samson, C.Mallet, L.David, M.Subileau, E.Tillet, J.J.Feige, and S.Bailly. 2012. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol. Life Sci.* 69:313-324.
- Birchmeier, C., and E.Gherardi. 1998. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 8:404-410.
- Birchmeier, C., W.Birchmeier, E.Gherardi, and G.F.Vande Woude. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:915-925.
- Bladt, F., D.Riethmacher, S.Isenmann, A.Aguzzi, and C.Birchmeier. 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376:768-771.
- Borowiak, M., A.N.Garratt, T.Wustefeld, M.Strehle, C.Trautwein, and C.Birchmeier. 2004. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:10608-10613.
- Brabletz, S., and T.Brabletz. 2010. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* 11:670-677.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Braun, L., M.Goyette, P.Yaswen, N.L.Thompson, and N.Fausto. 1987. Growth in culture and tumorigenicity after transfection with the ras oncogene of liver epithelial cells from carcinogen-treated rats. *Cancer Res.* 47:4116-4124.
- Breitkopf, K., S.Haas, E.Wiercinska, M.V.Singer, and S.Dooley. 2005. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29:1215-1315.
- Breitkopf, K., P.Godoy, L.Ciucan, M.V.Singer, and S.Dooley. 2006. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z. Gastroenterol.* 44:57-66.
- Brown, K.A., M.E.Aakre, A.E.Gorska, J.O.Price, S.E.Eltom, J.A.Pietenpol, and H.L.Moses. 2004. Induction by transforming growth factor-beta1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. *Breast Cancer Res.* 6:R215-R231.
- Brown, M.A., Q.Zhao, K.A.Baker, C.Naik, C.Chen, L.Pukac, M.Singh, T.Tsareva, Y.Parice, A.Mahoney, V.Roschke, I.Sanyal, and S.Choe. 2005. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J. Biol. Chem.* 280:25111-25118.
- Burns, T.F., I.Dobromilskaya, S.C.Murphy, R.P.Gajula, S.Thiyagarajan, S.N.Chatley, K.Aziz, Y.J.Cho, P.T.Tran, and C.M.Rudin. 2013. Inhibition of TWIST1 leads to activation of oncogene-induced senescence in oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer Res.* 11:329-338.
- Cain, K., S.H.Inayat-Hussain, C.Couet, and G.M. Cohen. 1996. A cleavage-site-directed inhibitor of interleukin-1 beta-converting enzyme-like proteases inhibits apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.* 314 (Pt 1):27-32.
- Caja, L., C.Ortiz, E. Bertran, M. M. Murillo, M.J.Miro-Obradors, E. Palacios, and I.Fabregat. 2007. Differential intracellular

- signalling induced by TGF-beta in rat adult hepatocytes and hepatoma cells: implications in liver carcinogenesis. *Cell Signal*. 19:683-694.
- Caja, L., P.Sancho, E.Bertran, D.Iglesias-Serret, J.Gil, and I.Fabregat. 2009. Overactivation of the MEK/ERK pathway in liver tumor cells confers resistance to TGF- β -induced cell death through impairing up-regulation of the NADPH oxidase NOX4. *Cancer Res*. 69:7595-7602.
- Caja, L., P.Sancho, E.Bertran, and I.Fabregat. 2011. Dissecting the effect of targeting the epidermal growth factor receptor on TGF-beta-induced-apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Hepatol*. 55:351-358.
- Cannito, S., E.Novo, L.V.di Bonzo, C.Busletta, S.Colombatto, and M.Parola. 2010. Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antioxid. Redox. Signal*. 12:1383-1430.
- Cano, A., M.A.Perez-Moreno, I.Rodrigo, A.Locascio, M.J.Blanco, M.G.del Barrio, F.Portillo, and M.A.Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol*. 2:76-83.
- Cantz, T., M.P.Manns, and M.Ott. 2008. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res*. 331:271-282.
- Caperuto, L.C., G.F.Anhe, T.D.Cambiaghi, E.H.Akamine, B.D.do Carmo, J.Cipolla-Neto, R.Curi, and S.Bordin. 2008. Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology* 149:6326-6335.
- Carmona-Cuenca, I., B.Herrera, J.J.Ventura, C.Roncero, M.Fernandez, and I.Fabregat. 2006. EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *J. Cell Physiol* 207:322-330.
- Carmona-Cuenca, I., C.Roncero, P.Sancho, L.Caja, N.Fausto, M.Fernandez, and I.Fabregat. 2008. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J. Hepatol*. 49:965-976.
- Castonguay, R., E.D.Werner, R.G.Matthews, E.Presman, A.W.Mulivor, N.Solban, D.Sako, R.S.Pearsall, K.W.Underwood, J.Seehra, R.Kumar, and A.V.Grinberg. 2011. Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J. Biol. Chem*. 286:30034-30046.
- Celeste, A.J., J.J.Song, Cox K, V.Rosen, and J.M.Wozney. 1994. Bone morphogenetic protein-9, a new member of the TGF-beta superfamily. *Bone Min Res* 136.
- Chayanupatkul, M., S.Honsawek, P.Vejchapipat, V.Chongsrisawat, and Y.Poororawan. 2009. Elevated serum bone morphogenetic protein 7 levels and clinical outcome in children with biliary atresia. *Eur. J. Pediatr. Surg*. 19:246-250.
- Chen, C., K.J.Grzegorzewski, S.Barash, Q.Zhao, H.Schneider, Q.Wang, M.Singh, L.Pukac, A.C.Bell, R.Duan, T.Coleman, A.Duttaroy, S.Cheng, J.Hirsch, L.Zhang, Y.Lazard, C.Fischer, M.C.Barber, Z.D.Ma, Y.Q.Zhang, P.Reavey, L.Zhong, B.Teng, I.Sanyal, S.M.Ruben, O.Blondel, and C.E.Birse. 2003. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat. Biotechnol*. 21:294-301.
- Chen, Y.R., A.Shrivastava, and T.H.Tan. 2001. Down-regulation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase M3/6 and activation of JNK by hydrogen peroxide and pyrrolidine dithiocarbamate. *Oncogene* 20:367-374.

- Chobert, M.N., D.Couchie, A.Fourcot, E.S.Zafrani, Y.Laperche, P.Mavier, and A.Brouillet. 2012. Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon tetrachloride intoxication in rats. *Lab Invest* 92:135-150.
- Clark, J.B., L.Rice, T.Sadiq, E.Brittain, L.Song, J.Wang, and D.A.Gerber. 2005. Hepatic progenitor cell resistance to TGF-beta1's proliferative and apoptotic effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329:337-344.
- Comes, F., A.Matrone, P.Lastella, B.Nico, F.C.Susca, R.Bagnulo, G.Ingravallo, S.Modica, S.G.Lo, A.Moschetta, G.Guanti, and C.Simone. 2007. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death. Differ.* 14:693-702.
- Comoglio, P.M., and L.Trusolino. 2002. Invasive growth: from development to metastasis. *J. Clin. Invest* 109:857-862.
- Coulouarn, C., V.M.Factor, and S.S.Thorgeirsson. 2008. Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology* 47:2059-2067.
- Crosas-Molist, E., E.Bertran, P.Sancho, J.Lopez-Luque, J.Fernando, A.Sanchez, M.Fernandez, E.Navarro, and I.Fabregat. 2014. The NADPH oxidase NOX4 inhibits hepatocyte proliferation and liver cancer progression. *Free Radic. Biol. Med.* 69:338-347.
- Cunha, S.I., and K.Pietras. 2011. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood* 117:6999-7006.
- Cuny, G.D., P.B.Yu, J.K.Laha, X.Xing, J.F.Liu, C.S.Lai, D.Y.Deng, C.Sachidanandan, K.D.Bloch, and R.T.Peterson. 2008. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg. Med Chem. Lett.* 18:4388-4392.
- Daly, A.C., R.A.Randall, and C.S.Hill. 2008. Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol. Cell Biol.* 28:6889-6902.
- David, L., C.Mallet, S.Mazerbourg, J.J.Feige, and S.Bailly. 2007. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109:1953-1961.
- David, L., C.Mallet, M.Keramidas, N.Lamande, J.M.Gasc, S.Dupuis-Girod, H.Plauchu, J.J.Feige, and S.Bailly. 2008. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.* 102:914-922.
- De Craene, B., and G.Berx. 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* 13:97-110.
- de Gouville, A.C., V.Boullay, G.Krysa, J.Pilot, J.M.Brusq, F.Loriolle, J.M.Gauthier, S.A.Papworth, A.Laroze, F.Gellibert, and S.Huet. 2005. Inhibition of TGF-beta signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* 145:166-177.
- Debacq-Chainiaux, F., J.D.Erusalimsky, J.Campisi, and O.Toussaint. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 4:1798-1806.
- del Castillo, G., M.M.Murillo, A.Alvarez-Barrientos, E.Bertran, M.Fernandez, A.Sanchez, and I.Fabregat. 2006. Autocrine production of TGF-beta confers resistance to apoptosis after an epithelial-mesenchymal transition process in hepatocytes: Role of EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* 312:2860-2871.

- del Castillo, G., V.M.Factor, M.Fernandez, A.Alvarez-Barrientos, I.Fabregat, S.S.Thorgeirsson, and A.Sanchez. 2008. Deletion of the Met tyrosine kinase in liver progenitor oval cells increases sensitivity to apoptosis in vitro. *Am. J. Pathol* 172:1238-1247.
- del Castillo, G., A.Alvarez-Barrientos, I.Carmona-Cuenca, M.Fernandez, A.Sanchez, and I.Fabregat. 2008. Isolation and characterization of a putative liver progenitor population after treatment of fetal rat hepatocytes with TGF-beta. *J. Cell Physiol* 215:846-855.
- Delgado, J.P., V.Vanneaux, J.Branger, T.Touboul, L.Sentilhes, S.Mainot, P.Lainas, P.Leclerc, G.Uzan, D.Mahieu-Caputo, and A.Weber. 2009. The role of HGF on invasive properties and repopulation potential of human fetal hepatic progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 315:3396-3405.
- Deng, H., H.F.Wang, Y.B.Gao, X.L.Jin, and J.C.Xiao. 2011. Hepatic progenitor cell represents a transitioning cell population between liver epithelium and stroma. *Med. Hypotheses* 76:809-812.
- Derynck, R., B.P.Muthusamy, and K.Y.Saetern. 2014. Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 31C:56-66.
- Desmet, V.J. 2001. The liver, Biology and Pathobiology. Lippincott, Philadelphia.
- Deugnier, Y. 2010. The iron driven pathway of hepcidin synthesis. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34:351-354.
- Dezso, K., P.Jelnes, V.Laszlo, K.Baghy, C.Bodor, S.Paku, N.Tygstrup, H.C.Bisgaard, and P.Nagy. 2007. Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-mediated liver regeneration. *Am. J. Pathol.* 171:1529-1537.
- Do, N., R.Zhao, K.Ray, K.Ho, M.Dib, X.Ren, P.Kuzontkoski, E.Terwilliger, and S.J.Karp. 2012. BMP4 is a novel paracrine inhibitor of liver regeneration. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 303:G1220-G1227.
- Dong, H.H., S.Xiang, X.P.Chen, H.F.Liang, W.Zhang, K.Jing, W.Zhang, W.G.Zhang, and L.Chen. 2009. The epithelial-mesenchymal transition promotes transdifferentiation of subcutaneously implanted hepatic oval cells into mesenchymal tumor tissue. *Stem Cells Dev.* 18:1293-1298.
- Dooley, S., H.Weng, and P.R.Mertens. 2009. Hypotheses on the role of transforming growth factor-beta in the onset and progression of hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis.* 27:93-101.
- Dooley, S., and P.ten Dijke. 2012. TGF-beta in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* 347:245-256.
- Dudas, J., T.Mansuroglu, D.Batusic, B.Saile, and G.Ramadori. 2007. Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. *Cell Tissue Res.* 329:503-514.
- Dudas, J., T.Mansuroglu, D.Batusic, and G.Ramadori. 2009. Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem. Cell Biol.* 131:115-127.
- Dumble, M.L., E.J.Croager, G.C.Yeoh, and E.A.Quail. 2002. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 23:435-445.
- Duncan, A.W., C.Dorrell, and M.Grompe. 2009. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 137:466-481.
- Erker, L., and M.Grompe. 2007. Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res.* 1:90-102.
- Fabregat, I., J.C.de, T.Nakamura, and M.Benito. 1992. Growth stimulation of

- rat fetal hepatocytes in response to hepatocyte growth factor: modulation of c-myc and c-fos expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189:684-690.
- Fabregat, I., C.Roncero, and M.Fernandez. 2007. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int.* 27:155-162.
- Fabregat, I. 2009. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* 15:513-520.
- Fabregat, I., J.Fernando, J.Mainez, and P.Sancho. 2014. TGF-beta signaling in cancer treatment. *Curr. Pharm. Des* 20:2934-2947.
- Fang, C.H., J.Q.Gong, and W.Zhang. 2004. Function of oval cells in hepatocellular carcinoma in rats. *World J. Gastroenterol.* 10:2482-2487.
- Finberg, K.E. 2013. Regulation of systemic iron homeostasis. *Curr. Opin. Hematol.* 20:208-214.
- Finsson, K.W., W.L.Parker, D.P.ten, M.Thorikay, and A.Philip. 2008. ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.* 23:896-906.
- Fischer, A.N., B.Herrera, M.Mikula, V.Proell, E.Fuchs, J.Gotzmann, R.Schulte-Hermann, H.Beug, and W.Mikulits. 2005. Integration of Ras subeffector signaling in TGF-beta mediated late stage hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 26:931-942.
- Franco, D.L., J.Mainez, S.Vega, P.Sancho, M.M.Murillo, C.A.de Frutos, C.G.del, C.Lopez-Blau, I.Fabregat, and M.A.Nieto. 2010. Snail1 suppresses TGF-beta-induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *J. Cell Sci.* 123:3467-3477.
- Galluzzi, L., I.Vitale, E.Vacchelli, and G.Kroemer. 2011. Cell death signaling and anticancer therapy. *Front Oncol.* 1:5.
- Gherardi, E., W.Birchmeier, C.Birchmeier, and W.G.Vande. 2012. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat. Rev. Cancer* 12:89-103.
- Giannelli, G., A.Mazzocca, E.Fransvea, M.Lahn, and S.Antonaci. 2011. Inhibiting TGF-beta signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* 1815:214-223.
- Gonzalez-Nunez, M., J.M.Munoz-Felix, and J.M.Lopez-Novoa. 2013. The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochim. Biophys. Acta* 1832:1492-1510.
- Gonzalez-Rodriguez, A., J.E.Clampit, O.Escribano, M.Benito, C.M.Rondinone, and A.M.Valverde. 2007. Developmental switch from prolonged insulin action to increased insulin sensitivity in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient hepatocytes. *Endocrinology* 148:594-608.
- Gordon, K.J., and G.C.Blobe. 2008. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1782:197-228.
- Goumans, M.J., F.Lebrin, and G.Valdimarsdottir. 2003. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc. Med* 13:301-307.
- Goyal, L., M.D.Muzumdar, and A.X.Zhu. 2013. Targeting the HGF/c-MET pathway in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 19:2310-2318.
- Gressner, O.A., M.S.Rizk, E.Kovalenko, R.Weiskirchen, and A.M.Gressner. 2008. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23:1024-1035.
- Grisham, J.W. 1983. Cell types in rat liver cultures: their identification and isolation. *Mol. Cell Biochem.* 53-54:23-33.

- Grompe, M. 2005. The origin of hepatocytes. *Gastroenterology* 128:2158-2160.
- Guicciardi, M.E., and G.J.Gores. 2005. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 54:1024-1033.
- Guo, X., L.Xiong, L.Zou, and J.Zhao. 2012. Upregulation of bone morphogenetic protein 4 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 18:635-640.
- Gutierrez-Uzquiza, A., M.Arechederra, I.Molina, R.Banos, V.Maia, M.Benito, C.Guerrero, and A.Porras. 2010. C3G down-regulates p38 MAPK activity in response to stress by Rap-1 independent mechanisms: involvement in cell death. *Cell Signal.* 22:533-542.
- Heldin, C.H., M.Landstrom, and A.Moustakas. 2009. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:166-176.
- Heron-Milhavet, L., and D.LeRoith. 2002. Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 277:15600-15606.
- Herrera, B., A.M.Alvarez, A.Sanchez, M.Fernandez, C.Roncero, M.Benito, and I.Fabregat. 2001. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. *FASEB J.* 15:741-751.
- Herrera, B., M.M.Murillo, A.Alvarez-Barrientos, J.Beltran, M.Fernandez, and I.Fabregat. 2004. Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 36:16-26.
- Herrera, B., and G.J.Inman. 2009. A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC. Cell Biol.* 10:20.
- Herrera, B., D.M.van, D.P.ten, and G.J.Inman. 2009. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 69:9254-9262.
- Herrera, B., A.Sanchez, and I.Fabregat. 2012. BMPS and liver: more questions than answers. *Curr. Pharm. Des* 18:4114-4125.
- Herrera, B., M.Garcia-Alvaro, S.Cruz, P.Walsh, M.Fernandez, C.Roncero, I.Fabregat, A.Sanchez, and G.J.Inman. 2013. BMP9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS. One.* 8:e69535.
- Higgins, G.M., and R.M.Anderson. 1931. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med* 12:186-202.
- Hiraga, R., M.Kato, S.Miyagawa, and T.Kamata. 2013. Nox4-derived ROS signaling contributes to TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 33:4431-4438.
- Horbelt, D., A.Denkis, and P.Knaus. 2012. A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:469-474.
- Horiguchi, N., H.Takayama, M.Toyoda, T.Otsuka, T.Fukusato, G.Merlino, H.Takagi, and M.Mori. 2002. Hepatocyte growth factor promotes hepatocarcinogenesis through c-Met autocrine activation and enhanced angiogenesis in transgenic mice treated

- with diethylnitrosamine. *Oncogene* 21:1791-1799.
- Hsiai, T., and J.A.Berliner. 2007. Oxidative stress as a regulator of murine atherosclerosis. *Curr. Drug Targets.* 8:1222-1229.
- Hsieh, S.Y., J.R.He, C.Y.Hsu, W.J.Chen, R.Bera, K.Y.Lin, T.C.Shih, M.C.Yu, Y.J.Lin, C.J.Chang, W.H.Weng, and S.F.Huang. 2011. Neuregulin/erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 autocrine loop contributes to invasion and early recurrence of human hepatoma. *Hepatology* 53:504-516.
- Hu-Lowe, D.D., E.Chen, L.Zhang, K.D.Watson, P.Mancuso, P.Lappin, G.Wickman, J.H.Chen, J.Wang, X.Jiang, K.Amundson, R.Simon, A.Erbersdobler, S.Bergqvist, Z.Feng, T.A.Swanson, B.H.Simmons, J.Lippincott, G.F.Casperson, W.J.Levin, C.G.Stampino, D.R.Shalinsky, K.W.Ferrara, W.Fiedler, and F.Bertolini. 2011. Targeting activin receptor-like kinase 1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis through a mechanism of action complementary to anti-VEGF therapies. *Cancer Res.* 71:1362-1373.
- Hu, M., M.Kurobe, Y.J.Jeong, C.Fuerer, S.Ghole, R.Nusse, and K.G.Sylvester. 2007. Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells. *Gastroenterology* 133:1579-1591.
- Huang, C., J.Li, M.Ding, S.S.Leonard, L.Wang, V.Castranova, V.Vallyathan, and X.Shi. 2001. UV Induces phosphorylation of protein kinase B (Akt) at Ser-473 and Thr-308 in mouse epidermal Cl 41 cells through hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 276:40234-40240.
- Hughes, R.D., R.R.Mitry, and A.Dhawan. 2012. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 93:342-347.
- Hugo, H.J., M.I.Kokkinos, T.Blick, M.L.Ackland, E.W.Thompson, and D.F.Newgreen. 2011. Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. *Cells Tissues. Organs* 193:23-40.
- Huh, C.G., V.M.Factor, A.Sanchez, K.Uchida, E.A.Conner, and S.S.Thorgeirsson. 2004. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:4477-4482.
- Ishikawa, T., V.M.Factor, J.U.Marquardt, C.Raggi, D.Seo, M.Kitade, E.A.Conner, and S.S.Thorgeirsson. 2012. Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* 55:1215-1226.
- Itoh, S., and P.ten Dijke. 2007. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:176-184.
- Itoh, T., Y.Kamiya, M.Okabe, M.Tanaka, and A.Miyajima. 2009. Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response. *FEBS Lett.* 583:777-781.
- Kang, S., J.Song, H.Kang, S.Kim, Y.Lee, and D.Park. 2003. Insulin can block apoptosis by decreasing oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase- and extracellular signal-regulated protein kinase-dependent signaling pathways in HepG2 cells. *Eur. J. Endocrinol.* 148:147-155.
- Kao, C.Y., V.M.Factor, and S.S.Thorgeirsson. 1996. Reduced growth capacity of hepatocytes from c-myc and c-myc/TGF-alpha transgenic mice in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222:64-70.
- Kaposi-Novak, P., J.S.Lee, L.Gomez-Quiroz, C.Coulouarn, V.M.Factor, and S.S.Thorgeirsson. 2006. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with

- poor prognosis and aggressive phenotype. *J. Clin. Invest* 116:1582-1595.
- Karihaloo, A., S.A.Karumanchi, W.L.Cantley, S.Venkatesha, L.G.Cantley, and S.Kale. 2005. Vascular endothelial growth factor induces branching morphogenesis/tubulogenesis in renal epithelial cells in a neuropilin-dependent fashion. *Mol. Cell Biol.* 25:7441-7448.
- Kato, M., S.Yoshimura, J.Kokuzawa, H.Kitajima, Y.Kaku, T.Iwama, J.Shinoda, T.Kunisada, and N.Sakai. 2004. Hepatocyte growth factor promotes neuronal differentiation of neural stem cells derived from embryonic stem cells. *Neuroreport* 15:5-8.
- Kinoshita, K., Y.Iimuro, K.Otogawa, S.Saika, Y.Inagaki, Y.Nakajima, N.Kawada, J.Fujimoto, S.L.Friedman, and K.Ikeda. 2007. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* 56:706-714.
- Kirstein, M.M., and A.Vogel. 2014. The pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis.* 32:545-553.
- Knight, B., V.B.Matthews, J.K.Olynyk, and G.C.Yeoh. 2005. Jekyll and Hyde: evolving perspectives on the function and potential of the adult liver progenitor (oval) cell. *Bioessays* 27:1192-1202.
- Knittel, T., S.Aurisch, K.Neubauer, S.Eichhorst, and G.Ramadori. 1996. Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up-regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. *Am. J. Pathol.* 149:449-462.
- Kokuzawa, J., S.Yoshimura, H.Kitajima, J.Shinoda, Y.Kaku, T.Iwama, R.Morishita, T.Shimazaki, H.Okano, T.Kunisada, and N.Sakai. 2003. Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol. Cell Neurosci.* 24:190-197.
- Konishi, H., H.Matsuzaki, M.Tanaka, Y.Takemura, S.Kuroda, Y.Ono, and U.Kikkawa. 1997. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett.* 410:493-498.
- Kosai, K., K.Matsumoto, S.Nagata, Y.Tsujimoto, and T.Nakamura. 1998. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:683-690.
- Kuramitsu, K., D.Y.Sverdlov, S.B.Liu, E.Csizmadia, L.Burkly, D.Schuppan, D.W.Hanto, L.E.Otterbein, and Y.Popov. 2013. Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation. *Am. J. Pathol.* 183:182-194.
- Lachenmayer, A., C.Alsinet, C.Y.Chang, and J.M.Llovet. 2010. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig. Liver Dis.* 42 Suppl 3:S264-S272.
- Lambeth, J.D. 2007. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic. Biol. Med* 43:332-347.
- Lamouille, S., J.Xu, and R.Derynck. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:178-196.
- Lebrin, F., M.Deckers, P.Bertolino, and D.P.ten. 2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc. Res.* 65:599-608.
- Lee, E.S., E.M.Han, Y.S.Kim, B.K.Shin, C.H.Kim, H.K.Kim, N.H.Won, B.W.Yeom, I.Kim, and A.S.Leong. 2005. Occurrence of c-kit+ tumor cells in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol* 124:31-36.

- Lee, J.K., K.M.Joo, J.Lee, Y.Yoon, and D.H.Nam. 2014. Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. *Onco. Targets. Ther.* 7:1933-1944.
- Lee, J.S., J.Heo, L.Libbrecht, I.S.Chu, P.Kaposi-Novak, D.F.Calvisi, A.Mikaelyan, L.R.Roberts, A.J.Demetris, Z.Sun, F.Nevens, T.Roskams, and S.S.Thorgeirsson. 2006. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat. Med.* 12:410-416.
- Levine, R.L., D.Garland, C.N.Oliver, A.Amici, I.Climent, A.G.Lenz, B.W.Ahn, S.Shaltiel, and E.R.Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186:464-478.
- Levine, R.L., J.A.Williams, E.R.Stadtman, and E.Shacter. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346-357.
- Li, C., X.Yang, Y.He, G.Ye, X.Li, X.Zhang, L.Zhou, and F.Deng. 2012. Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner. *Int. J. Med. Sci.* 9:862-871.
- Libbrecht, L., V.Desmet, D.B.Van, and T.Roskams. 2000. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J. Hepatol.* 33:76-84.
- Libbrecht, L., and T.Roskams. 2002. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13:389-396.
- Lin, C.C., J.P.Zhou, Y.P.Liu, J.J.Liu, X.N.Yang, A.Jazag, Z.P.Zhang, B.Guleng, and J.L.Ren. 2012. The silencing of Pokemon attenuates the proliferation of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo by inhibiting the PI3K/Akt pathway. *PLoS. One.* 7:e51916.
- Liu, K., Y.Shi, X.H.Guo, Y.B.Ouyang, S.S.Wang, D.J.Liu, A.N.Wang, N.Li, and D.X.Chen. 2014. Phosphorylated AKT inhibits the apoptosis induced by DRAM-mediated mitophagy in hepatocellular carcinoma by preventing the translocation of DRAM to mitochondria. *Cell Death. Dis.* 5:e1078.
- Ljubimova, J.Y., L.M.Petrovic, S.E.Wilson, S.A.Geller, and A.A.Demetriou. 1997. Expression of HGF, its receptor c-met, c-myc, and albumin in cirrhotic and neoplastic human liver tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 45:79-87.
- Lledias, F., P.Rangel, and W.Hansberg. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273:10630-10637.
- Lo, R.C., and I.O.Ng. 2013. Hepatic progenitor cells: their role and functional significance in the new classification of primary liver cancers. *Liver Cancer* 2:84-92.
- Lopez-Coviella, I., B.Berse, R.Krauss, R.S.Thies, and J.K.Blusztajn. 2000. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science* 289:313-316.
- Lowes, K.N., B.A.Brennan, G.C.Yeoh, and J.K.Olynyk. 1999. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am. J. Pathol.* 154:537-541.
- Lu, J.W., Y.Hsia, W.Y.Yang, Y.I.Lin, C.C.Li, T.F.Tsai, K.W.Chang, G.S.Shieh, S.F.Tsai, H.D.Wang, and C.H.Yuh. 2012. Identification of the common regulators for hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus X antigen in a mouse model. *Carcinogenesis* 33:209-219.
- Maegdefrau, U., T.Amann, A.Winklmeier, S.Braig, T.Schubert, T.S.Weiss, K.Schardt, C.Warnecke, C.Hellerbrand, and A.K.Bosserhoff. 2009. Bone morphogenetic protein 4 is induced in

- hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *J. Pathol.* 218:520-529.
- Maegdefrau, U., S.Arndt, G.Kivorski, C.Hellerbrand, and A.K.Bosserhoff. 2011. Downregulation of hemojuvelin prevents inhibitory effects of bone morphogenetic proteins on iron metabolism in hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 91:1615-1623.
- Maegdefrau, U., and A.K.Bosserhoff. 2012. BMP activated Smad signaling strongly promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Exp. Mol. Pathol.* 92:74-81.
- Maina, F., G.Pante, F.Helmbacher, R.Andres, A.Porthin, A.M.Davies, C.Ponzetto, and R.Klein. 2001. Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol. Cell* 7:1293-1306.
- Majumdar, A., S.A.Curley, X.Wu, P.Brown, J.P.Hwang, K.Shetty, Z.X.Yao, A.R.He, S.Li, L.Katz, P.Farci, and L.Mishra. 2012. Hepatic stem cells and transforming growth factor beta in hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9:530-538.
- Majumdar, M.K., E.Wang, and E.A.Morris. 2001. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J. Cell Physiol* 189:275-284.
- Majumder, P.K., N.C.Mishra, X.Sun, A.Bharti, S.Kharbanda, S.Saxena, and D.Kufe. 2001. Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ.* 12:465-470.
- Malarkey, D.E., K.Johnson, L.Ryan, G.Boorman, and R.R.Maronpot. 2005. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol. Pathol.* 33:27-34.
- Mani, S.A., W.Guo, M.J.Liao, E.N.Eaton, A.Ayyanan, A.Y.Zhou, M.Brooks, F.Reinhard, C.C.Zhang, M.Shipitsin, L.L.Campbell, K.Polyak, C.Brisken, J.Yang, and R.A.Weinberg. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-715.
- Mao, S.A., J.M.Glorioso, and S.L.Nyberg. 2014. Liver regeneration. *Transl. Res.* 163:352-362.
- Marcos, A., R.A.Fisher, J.M.Ham, M.L.Shiffman, A.J.Sanyal, V.A.Luketic, R.K.Sterling, A.S.Fulcher, and M.P.Posner. 2000. Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation* 69:1375-1379.
- Marquardt, J.U., and S.S.Thorgeirsson. 2010. Stem cells in hepatocarcinogenesis: evidence from genomic data. *Semin. Liver Dis.* 30:26-34.
- Marquardt, J.U., P.R.Galle, and A.Teufel. 2012. [Hepatocellular carcinoma: molecular pathogenesis and novel targets for therapy]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 137:855-860.
- Martindale, J.L., and N.J.Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell Physiol* 192:1-15.
- Martinez-Estrada, O.M., A.Culleres, F.X.Soriano, H.Peinado, V.Bolos, F.O.Martinez, M.Reina, A.Cano, M.Fabre, and S.Vilaro. 2006. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem. J.* 394:449-457.
- Martinez-Palacian, A., C.G.del, A.Suarez-Causado, M.Garcia-Alvaro, D.de Morena-Frutos, M.Fernandez, C.Roncero, I.Fabregat, B.Herrera, and A.Sanchez. 2013. Mouse hepatic oval cells require Met-dependent PI3K to impair TGF-beta-induced oxidative stress and apoptosis. *PLoS. One.* 8:e53108.
- Massague, J. 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell* 134:215-230.

- Massague, J. 2012. TGFbeta signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:616-630.
- Matsumoto K, H.Funakoshi, H.Takahashi, and K.Sakai. 2014. HGF-Met Pathway in Regeneration and Drug Discovery. *Biomedicines* 2:275-300.
- Matsumoto, K., and T.Nakamura. 2006. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int. J. Cancer* 119:477-483.
- Matsuzaki, K., T.Seki, and K.Okazaki. 2014. TGF-beta signal shifting between tumor suppression and fibro-carcinogenesis in human chronic liver diseases. *J. Gastroenterol.* 49:971-981.
- McGlynn, K.A., J.L.Petrick, and W.T.London. 2015. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: An Emphasis on Demographic and Regional Variability. *Clin. Liver Dis.* 19:223-238.
- Meulmeester, E., and P.ten Dijke. 2011. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J. Pathol.* 223:205-218.
- Meyer, C., J.Dzieran, Y.Liu, F.Schindler, S.Munker, A.Muller, C.Coulouarn, and S.Dooley. 2013. Distinct dedifferentiation processes affect caveolin-1 expression in hepatocytes. *Cell Commun. Signal.* 11:6.
- Michalopoulos, G.K. 2007. Liver regeneration. *J. Cell Physiol* 213:286-300.
- Michalopoulos, G.K. 2010. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am. J. Pathol.* 176:2-13.
- Michalopoulos, G.K. 2013. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr. Physiol* 3:485-513.
- Miller, A.F., S.A.Harvey, R.S.Thies, and M.S.Olson. 2000. Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J. Biol. Chem.* 275:17937-17945.
- Montesano, R., K.Matsumoto, T.Nakamura, and L.Orci. 1991. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67:901-908.
- Mookerjee, S.A., R.L.Goncalves, A.A.Gerencser, D.G.Nicholls, and M.D.Brand. 2015. The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production. *Biochim. Biophys. Acta* 1847:171-181.
- Moustakas, A., and C.H.Heldin. 2005. Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell Sci.* 118:3573-3584.
- Murillo, M.M., I.Carmona-Cuenca, C.G.del, C.Ortiz, C.Roncero, A.Sanchez, M.Fernandez, and I.Fabregat. 2007. Activation of NADPH oxidase by transforming growth factor-beta in hepatocytes mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor ligands through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Biochem. J.* 405:251-259.
- Nakamura, T., K.Nawa, and A.Ichihara. 1984. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1450-1459.
- Nakamura, T. 1989. [Molecular characterization of hepatocyte growth factor (HGF)]. *Seikagaku* 61:1243-1247.
- Nakamura, T., K.Sakai, T.Nakamura, and K.Matsumoto. 2011. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 Suppl 1:188-202.
- Naldini, L., K.M.Weidner, E.Vigna, G.Gaudino, A.Bardelli, C.Ponzetto, R.P.Narsimhan, G.Hartmann, R.Zarnegar, G.K.Michalopoulos, and . 1991. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10:2867-2878.

- Nguyen, L.N., M.H.Furuya, L.A.Wolfrain, A.P.Nguyen, M.S.Holdren, J.S.Campbell, B.Knight, G.C.Yeoh, N.Fausto, and W.T.Parks. 2007. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology* 45:31-41.
- Nieto, M.A. 2011. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:347-376.
- Nieto, M.A., and A.Cano. 2012. The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin. Cancer Biol.* 22:361-368.
- Nieto, M.A. 2013. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 342:1234850.
- Nolan-Stevaux, O., W.Zhong, S.Culp, K.Shaffer, J.Hoover, D.Wickramasinghe, and A.Ruefli-Brasse. 2012. Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies. *PLoS. One.* 7:e50920.
- O'Connor, J.W., and E.W.Gomez. 2014. Biomechanics of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition: implications for fibrosis and cancer. *Clin. Transl. Med* 3:23.
- Oertel, M., and D.A.Shafritz. 2008. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1782:61-74.
- Ogasawara, J., R.Watanabe-Fukunaga, M.Adachi, A.Matsuzawa, T.Kasugai, Y.Kitamura, N.Itoh, T.Suda, and S.Nagata. 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364:806-809.
- Ogunwobi, O.O., and C.Liu. 2011. Hepatocyte growth factor upregulation promotes carcinogenesis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via Akt and COX-2 pathways. *Clin. Exp. Metastasis* 28:721-731.
- Oishi, N., T.Yamashita, and S.Kaneko. 2014. Molecular biology of liver cancer stem cells. *Liver Cancer* 3:71-84.
- Okamoto, S., D.Krainc, K.Sherman, and S.A.Lipton. 2000. Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:7561-7566.
- Okano, J., G.Shiota, K.Matsumoto, S.Yasui, A.Kurimasa, I.Hisatome, P.Steinberg, and Y.Murawaki. 2003. Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309:298-304.
- Padua, D., and J.Massague. 2009. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* 19:89-102.
- Pagan, R., A.Sanchez, I.Martin, M.Llobera, I.Fabregat, and S.Vilaro. 1999. Effects of growth and differentiation factors on the epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. *J. Hepatol.* 31:895-904.
- Paku, S., J.Schnur, P.Nagy, and S.S.Thorgeirsson. 2001. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am. J. Pathol.* 158:1313-1323.
- Pardal, R., M.F.Clarke, and S.J.Morrison. 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3:895-902.
- Parikh, R.A., P.Wang, J.H.Beumer, E.Chu, and L.J.Appleman. 2014. The potential roles of hepatocyte growth factor (HGF)-MET pathway inhibitors in cancer treatment. *Onco. Targets. Ther.* 7:969-983.
- Park, J.E., D.Shao, P.D.Upton, P.Desouza, I.M.Adcock, R.J.Davies, N.W.Morrell, M.J.Griffiths, and S.J.Wort. 2012. BMP-9

- induced endothelial cell tubule formation and inhibition of migration involves Smad1 driven endothelin-1 production. *PLoS. One.* 7:e30075.
- Phaneuf, D., S.J.Chen, and J.M.Wilson. 2000. Intravenous injection of an adenovirus encoding hepatocyte growth factor results in liver growth and has a protective effect against apoptosis. *Mol. Med.* 6:96-103.
- Pompella, A., A.Paolicchi, A.Corti, and M.Franzini. 2013. Gamma-glutamyltransferase, H2O2-induced apoptosis and expression of catalase. *Toxicol. In Vitro* 27:991.
- Pop, C., and G.S.Salvesen. 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* 284:21777-21781.
- Preisegger, K.H., V.M.Factor, A.Fuchsbichler, C.Stumptner, H.Denk, and S.S.Thorgeirsson. 1999. Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease. *Lab Invest* 79:103-109.
- Principe, D.R., J.A.Doll, J.Bauer, B.Jung, H.G.Munshi, L.Bartholin, B.Pasche, C.Lee, and P.J.Grippio. 2014. TGF-beta: duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 106:djt369.
- Prindull, G. 2005. Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells? *Exp. Hematol.* 33:738-746.
- R**amakrishna, G., A.Rastogi, N.Trehanpati, B.Sen, R.Khosla, and S.K.Sarin. 2013. From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence. *Liver Cancer* 2:367-383.
- Rhyu, D.Y., Y.Yang, H.Ha, G.T.Lee, J.S.Song, S.T.Uh, and H.B.Lee. 2005. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:667-675.
- Robson, E.J., W.T.Khaled, K.Abell, and C.J.Watson. 2006. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. *Differentiation* 74:254-264.
- Rosario, M., and W.Birchmeier. 2003. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 13:328-335.
- Roskams, T. 2003. Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus. *J. Hepatol.* 39:431-434.
- Roskams, T. 2006. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 25:3818-3822.
- Rossi, J.M., N.R.Dunn, B.L.Hogan, and K.S.Zaret. 2001. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* 15:1998-2009.
- Russell, W.E., J.A.McGowan, and N.L.Bucher. 1984. Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J. Cell Physiol* 119:183-192.
- S**achsenmaier, C., A.Radler-Pohl, R.Zinck, A.Nordheim, P.Herrlich, and H.J.Rahmsdorf. 1994. Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* 78:963-972.
- Sambrook, J., E.F.Fritsch, and T.Manias. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. *Laboratory Press, USA.*
- Sanchez-Capelo, A. 2005. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:15-34.

- Sanchez, A., A.M.Alvarez, M.Benito, and I.Fabregat. 1995. Transforming growth factor beta modulates growth and differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *J. Cell Physiol* 165:398-405.
- Sanchez, A., A.M.Alvarez, M.Benito, and I.Fabregat. 1996. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J. Biol. Chem.* 271:7416-7422.
- Sancho, P., and I.Fabregat. 2010. NADPH oxidase NOX1 controls autocrine growth of liver tumor cells through up-regulation of the epidermal growth factor receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 285:24815-24824.
- Sancho, P., and I.Fabregat. 2011. The NADPH oxidase inhibitor VAS2870 impairs cell growth and enhances TGF-beta-induced apoptosis of liver tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 81:917-924.
- Sancho, P., J.Mainez, E.Crosas-Molist, C.Roncero, C.M.Fernandez-Rodriguez, F.Pinedo, H.Huber, R.Eferl, W.Mikulits, and I.Fabregat. 2012. NADPH oxidase NOX4 mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development. *PLoS. One.* 7:e45285.
- Sandhu, J.S., P.M.Petkov, M.D.Dabeva, and D.A.Shafritz. 2001. Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells. *Am. J. Pathol.* 159:1323-1334.
- Santibanez, J.F., M.Quintanilla, and C.Bernabeu. 2011. TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond)* 121:233-251.
- Santoni-Rugiu, E., P.Nagy, M.R.Jensen, V.M.Factor, and S.S.Thorgeirsson. 1996. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice co-expressing c-myc and transforming growth factor-alpha. *Am. J. Pathol.* 149:407-428.
- Santoni-Rugiu, E., P.Jelnes, S.S.Thorgeirsson, and H.C.Bisgaard. 2005. Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* 113:876-902.
- Scharpfenecker, M., D.M.van, Z.Liu, R.L.van Bezooijen, Q.Zhao, L.Pukac, C.W.Lowik, and D.P.ten. 2007. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J. Cell Sci.* 120:964-972.
- Schmidt, C., F.Bladt, S.Goedecke, V.Brinkmann, W.Zschiesche, M.Sharpe, E.Gherardi, and C.Birchmeier. 1995. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373:699-702.
- Schmieder, B., and C.S.Hill. 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:970-982.
- Schuldiner, M., O.Yanuka, J.Itskovitz-Eldor, D.A.Melton, and N.Benvenisty. 2000. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:11307-11312.
- Sell, S. 2001. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33:738-750.
- Senturk, S., M.Mumcuoglu, O.Gursoy-Yuzugullu, B.Cingoz, K.C.Akcali, and M.Ozturk. 2010. Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology* 52:966-974.
- Shen, X., Y.Zhang, Y.Feng, L.Zhang, J.Li, Y.A.Xie, and X.Luo. 2014. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell growth, induces apoptosis and causes S phase arrest in hepatocellular carcinoma by suppressing the AKT pathway. *Int. J. Oncol.* 44:791-796.
- Shi, Q., and G.E.Gibson. 2007. Oxidative stress and transcriptional regulation in

- Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 21:276-291.
- Shi, Y., and J.Massague. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.
- Shiota, G., K.Umeki, J.Okano, and H.Kawasaki. 1995. Hepatocyte growth factor and acute phase proteins in patients with chronic liver diseases. *J. Med.* 26:295-308.
- Sieber, C., J.Kopf, C.Hiepen, and P.Knaus. 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20:343-355.
- Sipos, F., and O.Galamb. 2012. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J. Gastroenterol.* 18:601-608.
- Sokal, E.M., F.Smets, A.Bourgois, M.L.Van, J.P.Buts, R.Reding, O.J.Bernard, V.Evrard, D.Latinne, M.F.Vincent, A.Moser, and H.E.Soriano. 2003. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 76:735-738.
- Song, J.J., A.J.Celeste, F.M.Kong, R.L.Jirtle, V.Rosen, and R.S.Thies. 1995. Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology* 136:4293-4297.
- Sosa, M.S., A.Avivar-Valderas, P.Bragado, H.C.Wen, and J.A.Aguirre-Ghiso. 2011. ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin. Cancer Res.* 17:5850-5857.
- Spear, B.T., L.Jin, S.Ramasamy, and A.Dobierzewska. 2006. Transcriptional control in the mammalian liver: liver development, perinatal repression, and zonal gene regulation. *Cell Mol. Life Sci.* 63:2922-2938.
- Star, G.P., M.Giovinazzo, and D.Langleben. 2010. Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: a potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc. Res.* 80:349-354.
- Steinberg, P., R.Steinbrecher, S.Radaeva, P.Schirmacher, H.P.Dienes, F.Oesch, and P.Bannasch. 1994. Oval cell lines OC/CDE 6 and OC/CDE 22 give rise to cholangio-cellular and undifferentiated carcinomas after transformation. *Lab Invest* 71:700-709.
- Stocker, E., and W.D.Heine. 1971. Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr. Pathol.* 144:400-408.
- Stoker, M., E.Gherardi, M.Perryman, and J.Gray. 1987. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327:239-242.
- Strasser, A., S.Cory, and J.M.Adams. 2011. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* 30:3667-3683.
- Suarez-Causado, A., Caballero D, E.Bertran, C.Roncero, A.Addante, M.García-Álvaro, M.Fernandez, B.Herrera, A.Porras, I.Fabregat, and A.Sanchez. 2015. HGF/c-Met signaling promotes liver progenitor cell migration and invasion by an epithelial-mesenchymal transition-independent, phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in an in vitro model. *BBA-MCR*. En prensa.
- Sugimoto, H., C.Yang, V.S.LeBleu, M.A.Soubasakos, M.Giraldo, M.Zeisberg, and R.Kalluri. 2007. BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J.* 21:256-264.
- Sun, H.C., and Z. Y.Tang. 2004. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130:307-319.
- Suzuki, Y., N.Ohga, Y.Morishita, K.Hida, K.Miyazono, and T.Watabe. 2010. BMP-9

- induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 123:1684-1692.
- Syn, W.K., Y.Jung, A.Omenetti, M.Abdelmalek, C.D.Guy, L.Yang, J.Wang, R.P.Witek, C.M.Fearing, T.A.Pereira, V.Teaberry, S.S.Choi, J.Conde-Vancells, G.F.Karaca, and A.M.Diehl. 2009. Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 137:1478-1488.
- Tacke, F., E.Gabele, F.Bataille, R.F.Schwabe, C.Hellerbrand, F.Klebl, R.H.Straub, T.Luedde, M.P.Manns, C.Trautwein, D.A.Brenner, J.Scholmerich, and B.Schnabl. 2007. Bone morphogenetic protein 7 is elevated in patients with chronic liver disease and exerts fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Dig. Dis. Sci.* 52:3404-3415.
- Takami, T., P.Kaposi-Novak, K.Uchida, L.E.Gomez-Quiroz, E.A.Conner, V.M.Factor, and S.S.Thorgeirsson. 2007. Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 67:9844-9851.
- Tanaka, M., T.Itoh, N.Tanimizu, and A.Miyajima. 2011. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem.* 149:231-239.
- Tanimizu, N., T.Tsujimura, K.Takahide, T.Kodama, K.Nakamura, and A.Miyajima. 2004. Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver. *Gene Expr. Patterns.* 5:209-218.
- ten Dijke, P. 2006. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Curr. Med. Res. Opin.* 22 Suppl 1:S7-11.
- ten Dijke, P., and H.M.Arthur. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:857-869.
- Tirnitz-Parker, J.E., G.C.Yeoh, and J.K.Olynyk. 2012. Liver Progenitor Cells, Cancer Stem Cells and Hepatocellular Carcinoma. In *Liver Regeneration*. Baptista P.M., editor. InTech.
- Townson, S.A., E.Martinez-Hackert, C.Greppi, P.Lowden, D.Sako, J.Liu, J.A.Ucran, K.Liharska, K.W.Underwood, J.Seehra, R.Kumar, and A.V.Grinberg. 2012. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J. Biol. Chem.* 287:27313-27325.
- Trusolino, L., A.Bertotti, and P.M.Comoglio. 2010. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:834-848.
- Tsan, M.F. 1997. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 214:107-113.
- Tulasne, D., and B.Foveau. 2008. The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death. Differ.* 15:427-434.
- Turley, E.A., M.Veiseh, D.C.Radisky, and M.J.Bissell. 2008. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5:280-290.
- Uehara, Y., O.Minowa, C.Mori, K.Shiota, J.Kuno, T.Noda, and N.Kitamura. 1995. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373:702-705.
- Upton, P.D., R.J.Davies, R.C.Trembath, and N.W.Morrell. 2009. Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 284:15794-15804.
- Valdes, F., A.M.Alvarez, A.Locascio, S.Vega, B.Herrera, M.Fernandez, M.Benito,

- M.A.Nieto, and I.Fabregat. 2002. The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Mol. Cancer Res.* 1:68-78.
- Van Hul, N.K., J.Abarca-Quinones, C.Sempoux, Y.Horsmans, and I.A.Leclercq. 2009. Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 49:1625-1635.
- van Zijl, F., G.Zulehner, M.Petz, D.Schneller, C.Kornauth, M.Hau, G.Machat, M.Grubinger, H.Huber, and W.Mikulits. 2009. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future. Oncol.* 5:1169-1179.
- Vande Woude, G.F., M.Jeffers, J.Cortner, G.Alvord, I.Tsarfaty, and J.Resau. 1997. Met-HGF/SF: tumorigenesis, invasion and metastasis. *Ciba Found. Symp.* 212:119-130.
- Vandewalle, C., R.F.Van, and G.Berx. 2009. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol. Life Sci.* 66:773-787.
- Viebahn, C.S., and G.C.Yeoh. 2008. What fires prometheus? The link between inflammation and regeneration following chronic liver injury. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:855-873.
- Wang, P., A.T.Yang, M.Cong, T.H.Liu, D.Zhang, J.Huang, X.F.Tong, S.T.Zhu, Y.Xu, S.Z.Tang, B.E.Wang, H.Ma, J.D.Jia, and H.You. 2015. EGF Suppresses the Initiation and Drives the Reversion of TGF-beta1-Induced Transition in Hepatic Oval Cells Showing the Plasticity of Progenitor Cells. *J. Cell Physiol.*
- Wang, S.L., C.Q.Yang, X.L.Qi, M.Yuan, Y.Z.Chang, L.Yang, and H.J.Gao. 2013. Inhibitory effect of bone morphogenetic protein-7 on hepatic fibrosis in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6:897-903.
- Wang, X., M.Foster, M.Al-Dhalimy, E.Lagasse, M.Finegold, and M.Grompe. 2003. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 Suppl 1:11881-11888.
- Wang, Y.D., F.Yang, W.D.Chen, X.Huang, L.Lai, B.M.Forman, and W.Huang. 2008. Farnesoid X receptor protects liver cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and fasting in vivo. *Mol. Endocrinol.* 22:1622-1632.
- Warburg, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123:314.
- Weidner, K.M., N.Arakaki, G.Hartmann, J.Vandekerckhove, S.Weingart, H.Rieder, C.Fonatsch, H.Tsubouchi, T.Hishida, Y.Daikuhara, and . 1991. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:7001-7005.
- Weiss, A., and L.Attisano. 2013. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley. Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2:47-63.
- Wen, W., J.Ding, W.Sun, J.Fu, Y.Chen, K.Wu, B.Ning, T.Han, L.Huang, C.Chen, D.Xie, Z.Li, G.Feng, M.Wu, W.Xie, and H.Wang. 2012. Cyclin G1-mediated epithelial-mesenchymal transition via phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling facilitates liver cancer progression. *Hepatology* 55:1787-1798.
- Wiercinska, E., L.Wickert, B.Denecke, H.M.Said, J.Hamzavi, A.M.Gressner, M.Thorikay, D.P.ten, P.R.Mertens, K.Breitkopf, and S.Dooley. 2006. Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 43:1032-1041.
- Wozney, J.M., V.Rosen, A.J.Celeste, L.M.Mitsock, M.J.Whitters, R.W.Kriz, R.M.Hewick, and E.A.Wang. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528-1534.
- Wu, F.S., S.S.Zheng, L.J.Wu, W.Ding, Z.M.Ma, Z.M.Wang, L.S.Teng, and W.H.Zhao. 2006.

- [Study on the prognostic value of hepatocyte growth factor and c-met for patients with hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Wai Ke. Za Zhi.* 44:603-608.
- Wu, K., J.Ding, C.Chen, W.Sun, B.F.Ning, W.Wen, L.Huang, T.Han, W.Yang, C.Wang, Z.Li, M.C.Wu, G.S.Feng, W.F.Xie, and H.Y.Wang. 2012. Hepatic transforming growth factor beta gives rise to tumor-initiating cells and promotes liver cancer development. *Hepatology* 56:2255-2267.
- Wu, W.S. 2006. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25:695-705.
- Xia, H., L.L.Ooi, and K.M.Hui. 2013. MicroRNA-216a/217-induced epithelial-mesenchymal transition targets PTEN and SMAD7 to promote drug resistance and recurrence of liver cancer. *Hepatology* 58:629-641.
- Xie, Q., K.D.Liu, M.Y.Hu, and K.Zhou. 2001. SF/HGF-c-Met autocrine and paracrine promote metastasis of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 7:816-820.
- Xu, D.J., Y.Z.Zhao, J.Wang, J.W.He, Y.G.Weng, and J.Y.Luo. 2012. Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *BMB. Rep.* 45:247-252.
- Xue, F., T.Takahara, Y.Yata, Y.Kuwabara, E.Shinno, K.Nonome, M.Minemura, S.Takahara, X.Li, E.Yamato, and A.Watanabe. 2003. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut* 52:694-700.
- Yang, W., H.X.Yan, L.Chen, Q.Liu, Y.Q.He, L.X.Yu, S.H.Zhang, D.D.Huang, L.Tang, X.N.Kong, C.Chen, S.Q.Liu, M.C.Wu, and H.Y.Wang. 2008. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res.* 68:4287-4295.
- Yang, X.R., Y.Xu, B.Yu, J.Zhou, S.J.Qiu, G.M.Shi, B.H.Zhang, W.Z.Wu, Y.H.Shi, B.Wu, G.H.Yang, Y.Ji, and J.Fan. 2010. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 59:953-962.
- Yao, P., Y.Zhan, W.Xu, C.Li, P.Yue, C.Xu, D.Hu, C.K.Qu, and X.Yang. 2004. Hepatocyte growth factor-induced proliferation of hepatic stem-like cells depends on activation of NF-kappaB. *J. Hepatol.* 40:391-398.
- You, H., W.Ding, H.Dang, Y.Jiang, and C.B.Rountree. 2011. c-Met represents a potential therapeutic target for personalized treatment in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 54:879-889.
- Young, K., B.Conley, D.Romero, E.Tweedie, C.O'Neill, I.Pinzi, L.Brogan, V.Lindner, L.Liaw, and C.P.Vary. 2012. BMP9 regulates endoglin-dependent chemokine responses in endothelial cells. *Blood* 120:4263-4273.
- Yovchev, M.I., P.N.Grozdanov, H.Zhou, H.Racherla, C.Guha, and M.D.Dabeva. 2008. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 47:636-647.
- Yu, P.B., C.C.Hong, C.Sachidanandan, J.L.Babitt, D.Y.Deng, S.A.Hoyng, H.Y.Lin, K.D.Bloch, and R.T.Peterson. 2008. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat. Chem. Biol.* 4:33-41.
- Yu, P.B., D.Y.Deng, C.S.Lai, C.C.Hong, G.D.Cuny, M.L.Bouxsein, D.W.Hong, P.M.McManus, T.Katagiri, C.Sachidanandan, N.Kamiya, T.Fukuda, Y.Mishina, R.T.Peterson, and K.D.Bloch. 2008. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nat. Med.* 14:1363-1369.

- Zaret, K.S., and M.Grompe. 2008. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 322:1490-1494.
- Zeisberg, M., C.Yang, M.Martino, M.B.Duncan, F.Rieder, H.Tanjore, and R.Kalluri. 2007. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 282:23337-23347.
- Zeisberg, M., and E.G.Neilson. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest* 119:1429-1437.
- Zhang, Y.E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19:128-139.
- Zhang, Y.W., and G.F.Vande Woude. 2003. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J. Cell Biochem.* 88:408-417.
- Zhao, Y., T.Song, W.Wang, J.Wang, J.He, N.Wu, M.Tang, B.He, and J.Luo. 2012. P38 and ERK1/2 MAPKs act in opposition to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *PLoS. One.* 7:e43383.
- Zheng, H., and Y.Kang. 2014. Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene* 33:1755-1763.
- Zheng, Y.W., and H.Taniguchi. 2003. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin. Liver Dis.* 23:337-348.
- Zhuge, J., and A.I.Cederbaum. 2006. Serum deprivation-induced HepG2 cell death is potentiated by CYP2E1. *Free Radic. Biol. Med.* 40:63-74.
- Zi, Z., D.A.Chapnick, and X.Liu. 2012. Dynamics of TGF-beta/Smad signaling. *FEBS Lett.* 586:1921-1928.
- Zilberberg, L., D.P.ten, L.Y.Sakai, and D.B.Rifkin. 2007. A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity. *BMC. Cell Biol.* 8:41.
- Trachootham, D., J.Alexandre, and P.Huang. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8:579-591.

9. ABSTRACT

NEW SIGNALS AND MECHANISMS INVOLVED IN LIVER CELLS REGULATION AND THEIR RELEVANCE IN HEPATOCARCINOGENESIS. ROLE OF BMP9 AND TGF- β .

INTRODUCTION

One of the more important characteristics of the liver is its high regenerative capacity. When hepatocyte response is impaired, liver progenitor cells are activated and repopulate the damaged liver, a complex process that requires the coordinated action of many different signals. Nevertheless, progenitor cells might contribute to fibrosis and are prone to malignant transformation, having been related to HCC (Hepatocellular Carcinoma) development.

In this work, we try to characterize some of the cellular and molecular mechanisms involved in liver regeneration and carcinogenesis. In particular, the relevance of two members of the TGF- β superfamily (TGF- β and BMP9) in regulation of liver cancer cells and progenitor cells.

TGF- β is a cytokine that plays an important role in liver pathophysiology controlling a big spectrum of cellular processes. In epithelial cells, such as hepatocytes, the best-characterized effects of TGF- β are the induction of growth arrest, apoptosis and EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition). Oxidative stress is involved in most of these effects. TGF- β -induced EMT is of particular interest due to its potential link with hepatic fibrosis and the fact that many chronic liver diseases associated with fibrosis can lead to HCC development.

Deregulation of BMP (Bone Morphogenetic Protein) signaling has also been implicated in cancer, having both pro- and anti-tumorigenic activities. Some BMP members like BMP4 and 6 are overexpressed in both human HCC cell lines and tissues. Additionally, BMP4 expression strongly correlates with high tumor grade. BMP9 was originally isolated from fetal liver and it is also expressed in adult healthy liver, but little is known about its role in liver physiology and pathology.

Another important pathway for liver physiopathology is that one driven by HGF and its receptor c-Met. Originally identified as a strong mitogen for mature hepatocytes, this pathway induces a variety of cellular responses, including survival, proliferation, differentiation, motility and extracellular matrix degradation. HGF/c-

Met axis has been demonstrated to be an essential pathway during liver development, but also, in regenerative responses after acute and chronic liver damage. Its role in liver cancer is not well understood, although aberrant activation of this pathway has been involved in tumor progression, particularly in tumor invasion and metastasis.

Interestingly, HGF/c-Met and TGF- β pathways often trigger opposite actions and functional interactions between these signals could be potentially very relevant in liver pathophysiology.

OBJECTIVES

1. Study the role of BMP9 in proliferation and survival in different liver cells, including liver tumor cells and non-transformed hepatocytes in different stages of development.
2. Analysis of the mechanisms and signaling pathways involved in BMP9 effect in liver tumor cells.
3. Establishment of stable lines of oval cells that have undergone an EMT process induced by TGF- β (T β T-OC). Analysis of c-Met signaling role in this process.
4. Phenotypic and functional characterization of oval cells after chronic EMT.
 - 4.1. Analysis of proliferative and survival capacity and invasiveness of T β T-OC compared with oval cells.
 - 4.2. Analysis of possible changes in oxidative metabolism and mitochondrial function in T β T-OC compared with oval cells.

MATERIALS AND METHODS

For BMP9-HCC studies different liver cell types were used including. THLE3 (human immortalized hepatocytes), neonatal immortalized mouse hepatocytes and primary mouse hepatocytes. Most experiments were carried out with HepG2 liver cancer cell line.

EMT phenotype was induced in oval cell lines by chronic treatment with TGF- β . we used oval cell lines harbouring a genetically inactivated Met tyrosine kinase (Met^{-/-} cells) and its control (Met^{flx/flx} cells). We also used oval cells transformed with Ras (Ras-OC) in specific experiments as oval cell tumor model.

RESULTS

BMP9 induces cell growth in liver tumor cells but not in non-transformed hepatocytes

The tumor cell line HepG2 was shown to respond to BMP9 in terms of cell growth with an increased proliferation rate. In order to extend these observations, we analyzed cell growth in response to BMP9 in different hepatic cells. Our data revealed that BMP9 promotes cell growth in liver cancer cell lines but this effect is not observed in non-transformed hepatocytes nor in oval cells. In addition, the growth effect observed in HepG2 cells was comparable to that observed with other potent liver mitogens like insulin or EGF (Epidermal Growth Factor). Importantly, HepG2 cells have gained a BMP9 autocrine production that supports their proliferation and anchorage independent growth. Moreover, BMP9 triggers cell cycle progression through cyclinD1 and p27 gene regulation and, furthermore, completely abolishes the increase of apoptotic cells induced by serum-withdrawal counteracting the up-regulation of different pro-apoptotic genes like Bim, Puma or Bax.

BMP9 induces survival in HepG2 cells through p38MAPK activation

The analysis of the signaling pathways triggered by BMP9 in HepG2 cell revealed that BMP9 induces the canonical pathway (Smad1,5,8) but also non-Smad signaling cascades, p38MAPK and PI3K/Akt. Meanwhile Smad1,5,8 and PI3K/Akt do not seem to contribute to BMP9 cell growth effect, we demonstrated that p38MAPK activation is required for the protective effect of BMP9 in low serum-induced apoptosis.

TGF- β induces a stable EMT in oval cells. HGF/c-Met axis is essential for cell progression after EMT

In this work, we analyze the role of EMT in oval cell function trying to understand its relevance for oval cell fate during liver regeneration, particularly its potential implication in fibrosis or tumorigenesis.

We have established oval cell lines with an EMT phenotype induced by TGF- β treatment (T β T-OC, for TGF- β treated oval cells). We show that c-Met activity is indispensable for long-term expansion and/or cell survival after EMT. In the absence of c-Met signaling cells undergo a senescence process that impairs cell culture progression, showing the critical contribution of the HGF/c-Met axis in cell expansion after the EMT process.

After TGF- β -induced EMT, oval cells show significant phenotypic and functional changes

Phenotypic and functional characterization of T β T-OC evidences the acquisition of resistance to TGF- β pro-apoptotic and pro-oxidant effects, an increased migratory/invasive capacity and a more glycolytic profile. However, T β T-OC display loss of Cancer Stem Cell markers, show no differences in cell growth kinetic and have no anchorage independent growth, discarding a malignant transformation process upon EMT.

Furthermore, T β T-OC show a strong change in oxidative metabolism with an increase in ROS content and a different response to stress induced by serum starvation and TGF- β treatment, evidencing an adaptive response in redox metabolism.

DISCUSSION

In the present work we have studied some of the mechanisms involved in liver cells regulation and its relevance in hepatocarcinogenesis.

On one hand, our data show that BMP9 effect in liver cells growth depends on their transformation status, as only tumor cell lines show an increased growth under BMP9 treatment. We describe a dual role for BMP9 in HCC, both promoting a proliferative response and exerting anti-apoptotic function in HepG2 cells. In addition, we demonstrate that BMP9 promotes cell growth in HepG2 via p38MAPK, through the impairment of the apoptotic response induced by serum withdrawal. Altogether, our findings suggest that BMP9 could be an important player in the adaptive response activated against adverse conditions, such as growth factor or nutrients lack, during tumor progression.

On the other hand, we demonstrate that TGF- β induces a chronic EMT process in oval cells and evidence a functional cooperation with the HGF/c-Met axis during this process to allow overcome senescence and cell progression. EMT confers oval cells a more aggressive phenotype. Although some of their features correlate with those observed in Ras-OC, EMT *per se* is not sufficient to induce malignant transformation in oval cells. We cannot discard that such transformation occurs *in vivo* upon an appropriate microenvironment. In any event, phenotypic changes might provide them with adaptive advantages supporting their expansion in unfavorable environments, therefore increasing their integration and expansion in the damaged liver.

MAIN CONCLUSIONS

Altogether, our findings contribute to better understand the regulatory mechanisms mediating BMP9 and TGF- β actions in hepatocarcinogenesis and/or liver regeneration. On one hand, we highlight the potential protumorigenic role of BMP9 through p38MAPK pathway in HCC and point at it as a potential therapeutic target for HCC intervention. Furthermore, we show that the EMT process triggered by TGF- β in oval cells induces significant changes that could enhance their repopulating capacity but also contribute to liver fibrosis or carcinogenesis in a damaged liver.

